

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Oberschleißheim
(Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner)

**Subtypisierung bayerischer *Mycobacterium caprae* Isolate aus
Wild- und Nutztier mittels der genetischen Variation in der
Region of difference four (RD4)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Janina Alexandra Domogalla
aus Herne

München 2014

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Korreferenten: Prof. Dr. Armin M. Scholz

Tag der Promotion: 8. Februar 2014

Für Heinrich Aloys Lüning

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei (1564 - 1642)

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Mykobakterien	3
1.1	Taxonomie und Eigenschaften	3
1.2	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Komplex (MTC)	4
1.2.1	Mitglieder des MTC	4
1.2.2	Tenazität	5
1.2.3	Pathogenese	5
1.3	Mykobakterielle Genome	6
2	Erreger der Rindertuberkulose	7
2.1	<i>Mycobacterium caprae</i>	8
2.2	Charakteristische SNPs von <i>M. caprae</i> und <i>M. bovis</i>	8
2.3	Regions of difference (RDs)	9
3	Rindertuberkulose	11
3.1	Rindertuberkulose in Deutschland	11
3.2	Bedeutung der Rindertuberkulose als Zoonose	13
3.3	Rindertuberkulose in Österreich	15
3.4	Tuberkulose bei Wildtieren	16
4	Diagnostik der Rindertuberkulose	18
4.1	Klinische Untersuchung	18
4.2	Pathologisch-anatomische Untersuchung	19
4.3	Intrakutan-Test	19
4.4	Interferon-Gamma (IFN- γ)-Test	20
4.5	Serologisch-diagnostische Nachweisverfahren	21
4.6	Mikroskopischer Nachweis	22
4.7	Kultureller Nachweis	22
4.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	23
5	Möglichkeiten zur Differenzierung des MTC	24
5.1	GenoType® MTBC	24
5.2	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)	25

5.3	Differenzierung durch Spoligotyping.....	25
5.4	Differenzierung durch MIRU-VNTR.....	27
5.5	Next generation sequencing (NGS).....	29
III	PUBLIKATION	30
IV	DISKUSSION.....	38
1	Bedeutung der Differenzierung von Rindertuberkuloseerregern	38
2	Differenzierung von <i>M. bovis</i> anhand der RD4	39
3	Möglichkeiten und Grenzen der Subtypisierung nach der RD4-Region.....	41
3.1	Sequenzen im Bereich der RD4-Region der Subtypen Lechtal und Karwendel.....	43
3.2	Überprüfung neuer <i>M. caprae</i> -Isolate am LGL	44
4	Ausblick	48
V	ZUSAMMENFASSUNG	50
VI	SUMMARY	52
VII	LITERATURVERZEICHNIS.....	54
VIII	ANHANG TABELLEN UND ABBILDUNGEN	72
IX	DANKSAGUNG.....	78

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AGES	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
BCG	Bacille Calmette-Guérin
bp	Basenpaar
CFP-10	10 kDa culture filtrate protein
DIVA	differentiation of infected from vaccinated animals
DNA	desoxyribonucleic-acid
DR	direct repeat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMIDA	Emerging and Major Infectious Diseases of Livestock
ESAT-6	6 kDa early secretory antigenic target
ext-RD9	exterior-RD9
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
<i>gyrB</i>	Gen, das die Untereinheit B der DNA-Gyrase kodiert
HELI	hypothetische Helikase
HIV	human immunodeficiency virus
IFN- γ	Interferon Gamma
IGV	Integrative Genomics Viewer
IS	Insertionselement
kb	Kilobase (1.000 bp)
<i>lepA</i>	Elongationsfaktor
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>

MIRU	mycobacterial interspersed repetitive unit
MOTT	<i>Mycobacteria</i> other than tuberculosis
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NGS	Next-generation-sequencing
NTM	nicht tuberkulöse Mykobakterien
NVL	non visible lesions
OIE	Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health)
ORF	open reading frame
<i>oxyR</i>	putativer Regulator der Alkaly-Hydroperoxid Reduktase
PCR	polymerase chain reaction
<i>pncA</i>	Pyrazinamidase Gen
PPD	purified protein derivate(s)
RD	region of difference
RD4	region of difference four
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RKI	Robert Koch-Institut
rRNA	ribosomale ribonucleic acid
SBS	sequencing by synthesis (Sequenzierung-durch-Synthese)
SNP	single nucleotide polymorphism
StMUG	bayerische Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit
TSN	Tierseuchennachrichten-System
VNTR	variable number of tandem repeats
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: phylogenetischer Stammbaum im MTC	10
Abbildung 2: geografische Verteilung der Rindertuberkuloseerreger in Deutschland	13
Abbildung 3: geografische Verteilung von <i>M.-caprae</i> -positiven Hirschen in Reutte, Österreich.	16
Abbildung 4: speziesspezifisches Bandenmuster des GenoType® MTBC	24
Abbildung 5: schematische Darstellung des Spoligotyping	26
Abbildung 6: Beispiel für einen VNTR-Locus	28
Abbildung 7: schematische Darstellung des Genoms von <i>M. caprae</i> und <i>M. bovis</i> im Bereich der RD4-Region	40
Abbildung 8: geografische Verteilung 43 RD4-typisierter <i>M.-caprae</i> -Isolate	45
Abbildung 9: Lage der Primer und Sonde der RD4-PCR der amtlichen Methodensammlung .	48

Abbildungsverzeichnis Anhang

Abbildung A 1: Darstellung der Genomsequenzen von <i>M. caprae</i> im Bereich der RD9 und RD12.....	76
Abbildung A 2: Visualisierung der RD4 long-range PCR-Produkte der RD4-Typen Karwendel und Allgäu durch Gelelektrophorese.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Genome von <i>M. tuberculosis</i> und <i>M. bovis</i>	7
Tabelle 2: SNPs zur Speziesdifferenzierung von <i>M. caprae</i> und <i>M. bovis</i>	9
Tabelle 3: angezeigte Rindertuberkulose-Ausbrüche in Deutschland und Bayern.....	12
Tabelle 4: Quellen zum Nachweis von <i>M. caprae</i> bei Nutz- und Wildtieren in Europa	18
Tabelle 5: Fehlinterpretation der <i>M. caprae</i> / <i>M. bovis</i> Speziesdifferenzierung durch die Verwendung von innerhalb der RD4-Sequenz liegenden Primern	39
Tabelle 6: RD4-Typisierung anhand der entwickelten vier PCR-Ansätze	42
Tabelle 7: RD4-PCR Ergebnisse für vier <i>M.-caprae</i> -Isolate aus Rindern im Vergleich zu den RD4-Typen Allgäu, Karwendel und Lechtal	46
Tabelle 8: Vergleich der MIRU-Typing Ergebnisse eines <i>M.-caprae</i> -Isolates aus einem Rind (Mühldorf 12/Rd90046) und den RD4-Typen Lechtal, Allgäu und Karwendel.....	47

Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle A 1: Angaben zur Durchführung der RD4 long-range PCR.....	72
Tabelle A 2: RD4-Typisierung von 35 neuen <i>M.-caprae</i> -Isolaten anhand der in der Publikation erstellten PCR-Ansätze.....	73
Tabelle A 3: Überblick der durchgeführten Teilprojekte zur Subtypisierung der <i>M.-caprae</i> -Isolate in Kooperation des LGL Oberschleißheim ¹ mit dem Genzentrum der LMU ² und der Medizinischen Universität Innsbruck ³	75

I EINLEITUNG

Als Erreger der Rindertuberkulose stellen *M. bovis* und *M. caprae* durch ihr zoonotisches Potenzial ein Infektionsrisiko für den Menschen dar (MÜLLER et al., 2013). Des Weiteren werden infolge der Minderung der Tiergesundheit, Produktivität und der erforderlichen Bekämpfungsmaßnahmen zum Schutz von Mensch und Tier durch diese Tierseuche weltweit erhebliche volkswirtschaftliche Schäden verursacht (FLI, 2010). In Deutschland gilt die Rindertuberkulose seit fast einem halben Jahrhundert als getilgt. Dennoch können seit den letzten Jahren in Bayern, insbesondere im Allgäu wieder verstärkt Ausbrüche von Rindertuberkulose festgestellt werden. Als Erreger wird vor allem *M. caprae* identifiziert. Ebenso werden *M.-caprae*-Infektionen beim Rotwild in der Alpenregion nachgewiesen (GERSTMAIR et al., 2011). In mehreren Mitgliedstaaten der Europäischen Union stellt die Tuberkulose bei Wildtieren eine kontinuierliche Quelle für Infektionen von Rindern dar. Sie kann ebenfalls als eine neu aufkommende (re-emerging) Krankheit mit großer Bedeutung für die Wirtschaft und die öffentliche Gesundheit angesehen werden (SCHOEPF et al., 2012). Um Aussagen über mögliche Infektketten und Übertragungswege treffen zu können, ist der epidemiologische Hintergrund der Tuberkuloseinfektionen von besonderer Bedeutung (VAN SOOLINGEN et al., 2001). Dazu ist eine Differenzierung der *M.-caprae*-Isolate unterhalb der Speziesebene erforderlich. Allerdings ist in der Literatur nur wenig über die genetischen Eigenschaften von *M. caprae* beschrieben, wodurch eine schnelle und sichere Charakterisierung erschwert wird.

Daher befasst sich diese Arbeit mit einer neuen Möglichkeit der Subtypisierung von bayerischen *M.-caprae*-Isolaten anhand der genetischen Unterscheidungsregion vier (Region of difference four, RD4). Durch die Datenanalyse einer Genomsequenzierung von *M.-caprae*-Isolaten mit verschiedenen PCR-Ansätzen konnten in dieser Arbeit erstmalig in zwölf bayerischen *M.-caprae*-Isolaten aus Wild- und Nutztier drei Variationen der RD4-Region nachgewiesen werden. Es wurden PCR-Protokolle entwickelt, die eine schnelle und sichere Differenzierung der RD4-Variation zulassen. Darüber hinaus ist anhand der RD4-Charakterisierung eine Einordnung von *M.-caprae*-Isolaten in drei Subtypen (Allgäu, Lechtal oder Karwendel) möglich. Die in dieser Arbeit etablierten PCR-Protokolle stellen im Vergleich zu bisherigen zeit- und arbeitsaufwendigen Methoden eine schnelle und sichere Differenzierungsmöglichkeit von *M.-caprae*-Isolaten dar. Daher können die entwickelten PCR-Ansätze leicht in der Routinediagnostik verwendet werden.

Des Weiteren konnte jeder Subtyp bereits aus Feldproben von Wild- und Nutztieren

nachgewiesen werden. Demzufolge kann auf einen Erregeraustausch zwischen Nutz- und Wildtier geschlossen werden. Allerdings lässt diese Erkenntnis keinen Rückschluss auf die Richtung der Infektionsübertragung oder die ursprüngliche Infektionsquelle zu.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Mykobakterien

1.1 Taxonomie und Eigenschaften

Mykobakterien zählen zu der Ordnung der Actinomycetales und gehören der Familie der Mycobacteriaceae an. Sie zeichnen sich als Saprophyten, opportunistische und obligate Krankheitserreger aus. Mykobakterien sind unbewegliche, gerade bis leichtgekrümmte Stäbchen von etwa 0,2 - 0,7 µm Breite und 1 - 10 µm Länge (ROLLE & MAYR, 1993). Für das Genus *Mycobacterium* wurden Alkohol- und Säurefestigkeit, ein 61 - 71 prozentiger Guanin-/Cytosin (G/C)-Gehalt in der DNA und eine aus 60 - 90 Kohlenstoffatomen bestehende Mykolsäure, die durch Pyrolyse in Fettsäuremethylester mit 22 - 26 Kohlenstoffatomen gespalten werden kann, als Charakteristika festgelegt (LEVY-FREBAULT & PORTALES, 1992). Mykobakterien zeigen ein aerobes bis mikroaerophiles Wachstum, wobei zwischen schnell und langsam wachsenden Spezies unterschieden wird (STAHL & URBANCE, 1990). Für eine intrazelluläre Persistenz in Makrophagen sind die Glykolipide der Zellwand und der Cordfaktor verantwortlich, durch die die Ansäuerung verhindert (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994) und die Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom blockiert wird. Die Erreger werden demzufolge nach der Phagozytose nicht abgetötet und persistieren in den Phagosomen der Makrophagen (CLEMENS & HORWITZ, 1995). Eine daraus folgende unzureichende zelluläre Immunantwort erleichtert eine Erregerausbreitung im Wirt (FLYNN & CHAN, 2001). Mykobakterien werden in die obligat humanpathogene Spezies *M. leprae*, die nicht tuberkulösen Mykobakterien (NTM) und die obligat pathogenen Erreger der Tuberkulose, die unter dem *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTC) zusammengefasst sind, unterteilt. NTM werden auch als *Mycobacteria other than tuberculosis* (MOTT) bezeichnet (NEUMEISTER et al., 1992). Sie kommen ubiquitär in der Umwelt vor und sind meist nur bedingt pathogen. Zu ihnen zählen die Spezies des *M.-avium*-Komplexes, *M. intracellulare* und atypische Mykobakterien. (ROLLE & MAYR, 1993).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTC)

1.2.1 Mitglieder des MTC

Zu dem MTC zählen die genetisch nah verwandten Spezies: *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis*, und der Impfstamm *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) (BROSCH et al., 2002; COUSINS et al., 2003; HUARD et al., 2006; VAN SOOLINGEN et al., 1994). *M. mungi* und *M. orygis* wurden 2010 und 2012 als neue Spezies des MTC vorgeschlagen (ALEXANDER et al., 2010; VAN INGEN et al., 2012).

Die Mitglieder des MTC stimmen zu 99,9 % in ihrem Genom überein und weisen somit einen verhältnismäßig niedrigen Genpolymorphismus auf (GARNIER et al., 2003). Horizontaler Gentransfer und Rekombinationsereignisse finden im MTC eher selten statt (HIRSH et al., 2004). Des Weiteren zeichnen sie sich durch eine fast identische Sequenz ihrer 16S rRNA aus und wären demnach vielmehr als Subspezies statt als einzelne Spezies zu bezeichnen (ROGALL et al., 1990). Dass sie sich dennoch in Pathogenität, Virulenz, Wirtsspezifität und Resistenzverhalten unterscheiden (BROSCH et al., 2002; SREEVATSAN et al., 1997), könnte auf eine unterschiedliche Genexpression, die nur 6 % des Gesamtgenoms betrifft (REHREN et al., 2007), und einzelne Punktmutationen (KARLSON & LESSEL, 1970) zurückgeführt werden.

M. tuberculosis ist der bedeutendste Erreger der Tuberkulose beim Menschen (WHO, 2012). Infektionen mit *M. tuberculosis* können aber auch in anderen Wirten, wie beispielsweise Rindern nachgewiesen werden (THAKUR et al., 2012).

Als Erreger der Rindertuberkulose spielen *M. bovis* und *M. caprae* die wichtigste Rolle beim Nutztier. Allerdings weisen sie im Allgemeinen ein breites Wirtsspektrum auf. So wurde *M. bovis* unter anderem bei Menschen, Rind (*Bos taurus*) (THAKUR et al., 2012), Wildschwein (*Sus scrofa*) (SANTOS et al., 2008), Fuchs (*Vulpus vulpus*), Rehwild (*Capreolus capreolus*) (ZANELLA et al., 2008), Rotwild (*Cervus elaphus*) (GORTÁZAR et al., 2008), Dachs (*Meles meles*) (JENKINS et al., 2008) oder auch Nashorn (*Diceros bicornis minor*) (ESPIE et al., 2009) nachgewiesen. Für *M. caprae* sind unter anderem Infektionen von Menschen (KUBICA et al., 2003), Rind (*Bos taurus*) (PRODINGER et al., 2005), Rotwild (*Cervus elaphus*) (PRODINGER et al., 2002), Ziege (*Capra aegagrus hircus*), Schwein (*Sus scrofa domestica*), Fuchs (*Vulpus vulpus*) (RODRÍGUEZ et al., 2011), Wildschwein (*Sus scrofa*) und Kamel (*Camelus ferus*) (ERLER et al., 2004) beschrieben.

M. bovis BCG stellt einen über 13 Jahre durch 230 Kulturpassagen entstandenen attenuierten Stamm eines virulenten *M. bovis* Stammes dar (GUÉRIN, 1957). Er wird in vielen Ländern, vor allem in Entwicklungsländern als Lebendimpfstoff gegen die Tuberkulose verwendet. In Deutschland wird die Impfung von der Ständigen Impfkommision am Robert Koch-Institut (RKI) seit 1998 wegen des geringen Infektionsrisikos nicht mehr empfohlen (RKI, 2013a). Durch kontinuierliche Subkultivierung wurde *M. bovis* BCG über Jahrzehnte hinweg aufrechterhalten. Dies führte zu genetischen Polymorphismen und somit zu einer Vielzahl genetisch unterschiedlicher *M. bovis* BCG Stämmen, wie zum Beispiel BCG-Pasteur oder BCG-Tokyo (BEHR & SMALL, 1999).

1.2.2 Tenazität

Tuberkuloseerreger können in der Rohmilch von infizierten Rindern nachgewiesen werden und eine Infektionsgefahr für den Menschen darstellen (EREQAT et al., 2013). Durch eine thermische Behandlung beispielsweise bei 62,8 °C für 30 Minuten oder bei 71,7 °C für 15 Sekunden werden die Mykobakterien allerdings abgetötet (HARRINGTON & KARLSON, 1965). Des Weiteren verlieren Mykobakterien unter Einfluss von Säure sehr schnell an Überlebensfähigkeit (NEUMEISTER et al., 1992). Hingegen bewirken das langsame Wachstum und der Aufbau der Zellwand eine hohe Tenazität gegenüber Umweltfaktoren (GONZALEZ-Y-MERCHAND et al., 1997). In experimentell beimpften Proben wurde die Überlebensdauer von *M. bovis* unter natürlichen Wetterbedingungen über einen Zeitraum von einem Jahr untersucht. Es wurde eine Überlebensfähigkeit von vermehrungsfähigen Erregern bis zu 88 Tage in Erde, 58 Tage in Wasser und Heu sowie 43 Tage in Getreide nachgewiesen. Dabei ist das Überleben von *M. bovis* abhängig von den vorherrschenden Wetterbedingungen. Erhöhte Temperaturen, eine intensive Sonneneinstrahlung und Feuchtigkeitsverlust im Frühling und Sommer verringern die Überlebensfähigkeit in der Umwelt signifikant (FINE et al., 2011).

1.2.3 Pathogenese

Meist äußert sich die Tuberkulose als eine respiratorische Erkrankung (pulmonale Tuberkulose) (WHO, 2012). Sie kann aber auch den Gastrointestinaltrakt, Knochen und andere Organe (extrapulmonale Tuberkulose) betreffen (PETO et al., 2009). Eine Infektion mit Tuberkuloseerregern erfolgt über die Inhalation bakterienhaltiger Aerosole, perkutan oder oral (LITTLE et al., 1982; MENZIES et al., 2000; NUGENT et al., 2013). Der Primärherd an der

Eintrittspforte und der beteiligte regionale Lymphknoten werden als Primärkomplex zusammengefasst (WALLGREN et al., 1948). Je nach Abwehrlage des infizierten Organismus werden nachfolgend verschiedene Verlaufsformen beschrieben. Ein geschwächtes Immunsystem kann zu einer Generalisation führen (SMITH, 2003), bei der sich die Tuberkuloseerreger in verschiedenen Organen ausbreiten (Miliartuberkulose) (WALLGREN et al., 1948). Dagegen besteht bei einem intakten Immunsystem die Möglichkeit einer persistenten Infektion ohne klinische Manifestation der Tuberkulose (SMITH, 2003). Infolge einer Immunsuppression kann es allerdings nach Jahren zu einem Krankheitsausbruch kommen (Reaktivierung). Sobald eine Erregerausscheidung erfolgt, wird die Tuberkulose als infektiös (offen) bezeichnet (PARRISH et al., 1998). Abhängig von dem betroffenen Organsystem können dann Erreger über die Atemluft, Kot, Sekrete des Urogenitaltrakts oder mit der Milch ausgeschieden werden (FIRDESSA et al., 2012; RKI, 2013a; SMITH, 2003).

1.3 Mykobakterielle Genome

M. tuberculosis H37 wurde 1905 aus einem Menschen isoliert und 1934 in den virulenten und avirulenten Stamm H37Rv und H37Ra unterteilt (STEENKEN et al., 1934). *M. tuberculosis* H37Rv ist der meist verwendete pathogene Stamm in der Tuberkuloseforschung (BIFANI et al., 2000; CAMUS et al., 2002). Das Gesamtgenom von *M. tuberculosis* H37Rv wurde 1998 sequenziert. In dem Genom identifizierte offene Leseraster (open reading frame, ORF) wurden anhand von Rv-Nummern mit dem Startpunkt Rv0001 durchnummeriert. Bei Vorlage weiterer Informationen zu den ORFs, werden zusätzlich Gen-Namen vergeben. Beispielsweise wurde der Rv-Nummer Rv0005 der Gen-Name *gyrB* zugeordnet (COLE et al., 1998). Durch eine Aktualisierung der vorhandenen Informationen (Re-Annotation) zum *M. tuberculosis* H37Rv Genom wurden weitere ORFs identifiziert. Um die ursprüngliche Nummerierung zu erhalten, wurden Rv-Unternummern mit A, B, C eingeführt (CAMUS et al., 2002). In Form der TubercuList wurde eine Datenbank für das Genom von *M. tuberculosis* H37Rv erstellt (CAMUS et al., 2002; COLE, 1999). Durch eine Suchfunktion über die Rv-Nummer oder den speziellen Gen-Namen können Informationen über die Lage der Gene im Genom, die Funktion und die Nukleotidsequenz abgerufen werden (<http://tuberculist.epfl.ch/>). Da der Laborstamm *M. tuberculosis* H37Rv über Jahrzehnte in vitro kultiviert worden ist, wurde 2002 die Gesamtgenomsequenz von einem weiteren *M. tuberculosis* Stamm, *M. tuberculosis* CDC1551 veröffentlicht (FLEISCHMANN et al., 2002). Bei diesem Stamm handelt es sich ebenfalls um ein Isolat aus einem Menschen (BISHAI et al., 1999). Im Genom von *M. tuberculosis*

CDC1551 wurde eine abweichende Anzahl von ORFs im Vergleich zu *M. tuberculosis* H37Rv identifiziert (Tabelle 1). Allerdings ist diese ermittelte Anzahl abhängig von dem verwendeten Algorithmus (GARNIER et al., 2003). Das Gesamtgenom von *M. bovis* wurde von Garnier et al. entschlüsselt. Dabei handelt es sich um den klinischen Stamm *M. bovis* AF2122/97, der 1997 von einem Rind in Großbritannien isoliert wurde. Die Genomsequenz gibt Einblicke in die Evolution, Wirtsspezifität und Pathobiologie von *M. bovis*. Vergleiche mit dem Genom von *M. tuberculosis* H37Rv und CDC1551 zeigten, dass die Nukleotidsequenz von *M. bovis* AF2122/97 zu 99,95 % identisch mit der von *M. tuberculosis* ist. Dies bezüglich haben hauptsächlich Deletionen die Genomgröße von *M. bovis* verringert (Tabelle 1). Im Genom von *M. bovis* wurden zudem weniger potentiell proteincodierende Gene und über 2.420 Polymorphismen auf Einzelnukleotidebene (single nucleotide polymorphism, SNP) im Vergleich zu den beiden *M. tuberculosis* Stämmen identifiziert (Tabelle 1). Im Allgemeinen zeigen Zellwandkomponenten und sekretorische Proteine, welche die Reaktion zwischen Wirt und Makrophagen beeinflussen, die größte Variation. Darüber hinaus wurden keine zusätzlichen speziellen Gene im Genom von *M. bovis* identifiziert (GARNIER et al., 2003).

Tabelle 1: Vergleich der Genome von *M. tuberculosis* und *M. bovis*

Stamm	Genomgröße bp	ORF	G/C Gehalt %	im Vergleich zu <i>M. bovis</i>	
				SNPs	Deletionen ≥ 1bp
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	4.411.532	3.995	65,6	2.437	205
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	4.403.836	4.249	65,6	2.423	221
<i>M. bovis</i> AF2122/97	4.345.492	3.951	65,6	-	-

Angaben nach GARNIER et al., 2003

2 Erreger der Rindertuberkulose

Als Rindertuberkulose gilt im Sinne der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung) die nachgewiesene Infektion von Boviden mit *M. caprae* oder *M. bovis* (RindTbV, 2013).

2.1 *Mycobacterium caprae*

1999 wurde *M. caprae* erstmals bei Ziegen in Spanien nachgewiesen. Anfangs wurde dieser Erreger als Subspezies von *M. tuberculosis* (ARANAZ et al., 1999) und später von *M. bovis* (NIEMANN et al., 2002) diskutiert. Erst seit 2003 gilt *M. caprae* aufgrund von SNPs in bestimmten Genen sowie dem Fehlen oder Vorhandensein von längeren Sequenzabschnitten (regions of difference, RDs) als eigenständige Spezies im MTC (ARANAZ et al., 2003). Basierend auf diesen Ergebnissen wird angenommen, dass *M. caprae* phylogenetisch älter als *M. bovis* ist (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002).

2.2 Charakteristische SNPs von *M. caprae* und *M. bovis*

Als Merkmal zur Differenzierung von *M. bovis* von den anderen Erregern des MTC gilt hauptsächlich die natürliche Resistenz gegen Pyrazinamide (ARANAZ et al., 2003; KARLSON & LESSEL, 1970). Der Resistenzmechanismus wird durch einen SNP im Gen der Pyrazinamidase (*pncA*) (Tabelle 2) hervorgerufen (SCORPIO & ZHANG, 1996). Als *M. caprae* noch als Subspezies von *M. bovis* diskutiert wurde, wurde *M. bovis* in Pyrazinamid resistente und sensible Stämme unterteilt (NIEMANN et al., 2002).

Ein gemeinsames genetisches Unterscheidungsmerkmal von *M. caprae* und *M. bovis* zu allen anderen Mitgliedern des MTC ist die Punktmutation im Gen der *oxyR* (im Rahmen der oxidativen Stressantwort putativer Regulator der Alkaly-Hydroperoxid Reduktase) (Tabelle 2) (BROSCH et al., 2002; ESPINOSA et al., 1998). Da allerdings davon ausgegangen wird, dass es sich bei dem Gen der *oxyR* um ein Pseudogen handelt, wird der SNP als stumme Mutation angesehen (DERETIC et al., 1995; ESPINOSA et al., 1998).

Das Gen der Gyrase B (*gyrB*) codiert die Untereinheit B der DNA-Gyrase (ADACHI et al., 1987). Durch einen Sequenzpolymorphismus in diesem Gen ist eine Differenzierung zwischen den Erregern des MTC möglich (Tabelle 2) (KASAI et al., 2000; NIEMANN et al., 2000). Mit einer konventionellen PCR kann ein 1020 bp langes Fragment amplifiziert werden, in dem alle differenzierenden SNPs des *gyrB* Gens enthalten sind (KASAI et al., 2000). Die Sequenzpolymorphismen werden unter anderem im GenoType® MTBC Testsystem zur Differenzierung der MTC-Erreger aus Kulturmaterial verwendet (siehe Abschnitt 5.1) (BONIOTTI et al., 2009; RICHTER et al., 2004).

Der Elongationsfaktor (*lepA*) ist auf einer Nukleotidsequenz von 1962 bp (Basenpaar) Länge lokalisiert. Reddington et al. detektierten im *lepA* Gen einen Spezies spezifischen SNP in fünf *M. caprae*-Isolaten (Tabelle 2) (REDDINGTON et al., 2011).

Tabelle 2: SNPs zur Speziesdifferenzierung von *M. caprae* und *M. bovis*

Gen	Position	SNP	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i>	andere Spezies des MTC	spezifisch für
<i>pncA</i>	169	C zu G	-	+	-	<i>M. bovis</i>
<i>oxyR</i>	285	G zu A	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
<i>gyrB</i>	756	G zu A	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
	1311	T zu G	+	-	-	<i>M. caprae</i>
	1410	C zu T	-	+	-	<i>M. bovis</i>
	1450	G zu T	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
<i>lepA</i>	690	C zu T	+	-	-	<i>M. caprae</i>

T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin

beruhend auf Literaturangaben:

+ SNP ist vorhanden

- SNP ist nicht vorhanden

2.3 Regions of difference (RDs)

Durch vergleichende Sequenzanalysen der Referenzstämme *M. tuberculosis* H37Rv und *M. bovis* BCG Pasteur konnten variable Regionen (RD) im mykobakteriellen Genom nachgewiesen werden (GORDON et al., 1999). Die RDs stellen Sequenzen mit einer Länge von 2 - 12,7 kb (Kilobase) dar, die in den Genomen der Mitglieder des MTC unterschiedlich deletiert sind. Anhand verschiedener Hybridisertechniken, PCR-Ansätzen und Vergleiche von Genomsequenzen in 100 klinischen MTC-Isolaten wurden 14 RDs identifiziert, durch die die Differenzierung der Spezies erfolgen kann (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002).

Unter der Voraussetzung, dass die RD-Sequenz jeweils im Vorgängerstamm deletiert ist, lässt sich ein möglicher Evolutions-Stammbaum für den MTC erstellen (Abbildung 1). Da in den Genomen von *M. tuberculosis* und *M. canettii* alle RD-Sequenzen vorliegen, wird davon ausgegangen, dass sich die anderen Mitglieder des MTC aus ihnen entwickelt haben. Die erste RD-Deletion, die in allen abstammenden Spezies fehlt, ist die RD9 (BROSCH et al., 2002). Für

M. bovis und *M. caprae* sind die gemeinsamen Deletionen von RD9, RD7, RD8, RD10, RD5, RD6, RD12 und RD13 beschrieben (ARANAZ et al., 2003). Sie unterscheiden sich bezogen auf die RDs nur durch die Präsenz und Absenz der RD4-Region. Die RD4-Region stellt eine 12,7 kb umfassende Sequenz dar, die im Genom von *M. bovis* deletiert ist. Dagegen soll die RD4-Sequenz im Genom von *M. caprae* konserviert vorliegen (ARANAZ et al., 2003; SOMOSKOVI et al., 2008). Demnach weist das Genom von *M. bovis* die meisten Deletionen der variablen Regionen auf und *M. bovis* gilt als jüngster Vertreter der pathogenen Mitglieder des MTC. Dies widerlegt die vorherrschende Hypothese, dass *M. tuberculosis* von *M. bovis* abstammt (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2007a). Denn vor diesen phylogenetischen Untersuchungen, war die Ansicht verbreitet, dass *M. bovis* vor ca. 10.000 - 15.000 Jahren durch die Rinder-Domestikation auf den Menschen übergegangen ist und sich an ihn adaptiert hat (STEAD et al., 1995).

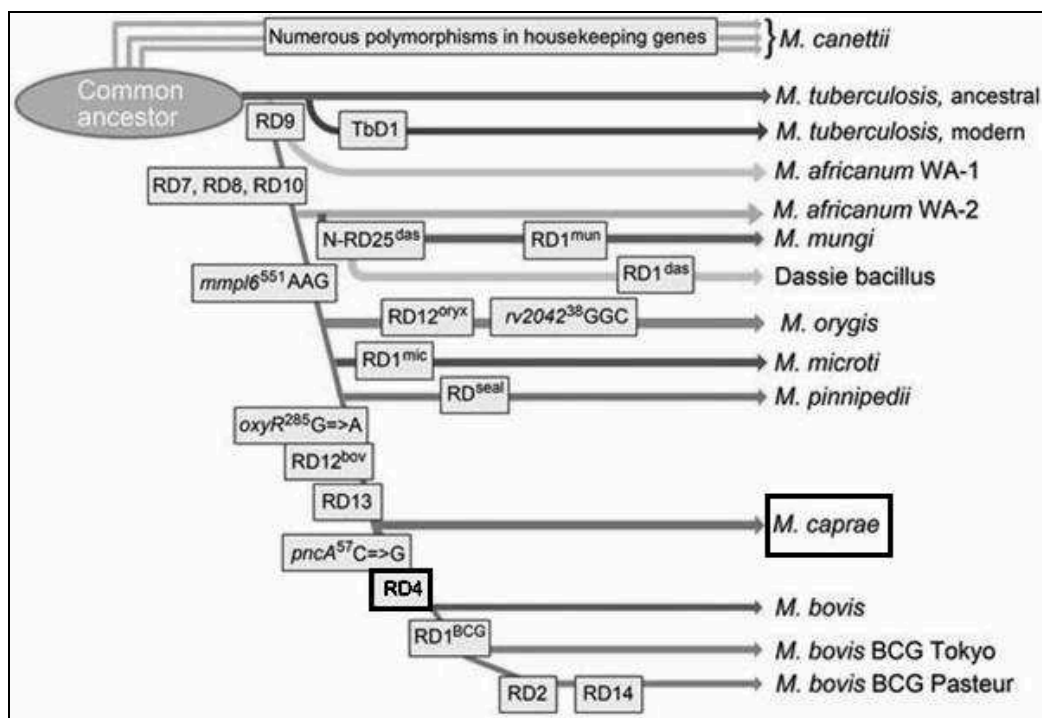


Abbildung 1: phylogenetischer Stammbaum im MTC

Die Differenzierung beruht auf der Präsenz und Absenz von RDs und SNPs im Genom der MTC-Mitglieder

Deletion der RDs und SNPs in den jeweiligen Genen: ☐

basiert auf BROSCH et al., 2002; modifiziert von VAN INGEN et al., 2012

Durch die Analyse der RD-Regionen wird in der Literatur für *M. bovis* neben der typischen Pyrazinamid-Resistenz verbreitet die Deletion der RD4-Region als Merkmal angesehen. Verschiedene PCR-Ansätze, die *M. bovis* durch die fehlende RD4-Sequenz von den anderen Erregern des MTC abgrenzen, werden beschrieben (GORDON et al., 1999; HALSE et al., 2011; HUARD et al., 2003; PINSKY et al., 2008). Die Deletion der RD4-Sequenz im Genom von *M. bovis* ist auf über 2000 Jahre zurückzuführen. Dies belegt eine Studie, in der *M. bovis* DNA in 2000 Jahre alten Knochen nachgewiesen werden konnte. Die Deletion der RD4-Sequenz wurde dabei mittels einer PCR unter Verwendung von flankierenden Primern nachgewiesen (TAYLOR et al., 2007a). In Anbetracht dessen ist es bemerkenswert, dass fünf RDs in *M. bovis* BCG nur innerhalb von 50 Jahren in vitro durch die intensive Passagierung deletiert sind (BEHR et al., 1999; TAYLOR et al., 2007a). Die wichtigste Deletion für den attenuierten Stamm *M. bovis* BCG ist dabei der Verlust der RD1. Denn in dieser Region ist das Gen ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target) codiert, welches eine Rolle bei der T-Zellantwort spielt (siehe Abschnitt 4.4) (PYM et al., 2002; SØRENSEN et al., 1995).

3 Rindertuberkulose

3.1 Rindertuberkulose in Deutschland

Seit 1997 gilt die Bundesrepublik Deutschland mit der Entscheidung 97/76/EG als amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose (ENTSCHEIDUNG 1999/467/EG). Vorherige flächendeckende Tuberkulinisierungen wurden mit Erhalt des Status in Deutschland eingestellt (FLI, 2010) und durch Untersuchungen im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung mit der Neufassung der Verordnung zum Schutz vor Rindertuberkulose abgelöst (RindTbV, 2013).

Der Status der amtlich anerkannten Tuberkulosefreiheit eines Mitgliedstaats oder eines Teils eines Mitgliedstaats bleibt gemäß der Richtlinie 64/432/EWG in der aktuell gültigen Fassung erhalten, sofern in sechs aufeinanderfolgenden Jahren die Rinderbestände, bei denen sich bestätigte, dass sie mit Tuberkulose infiziert sind, im Jahresdurchschnitt höchstens 0,1 % aller Rinderbestände ausmachen, und mindestens 99,9 % der Rinderbestände in sechs aufeinanderfolgenden Jahren jedes Jahr den Status der amtlich anerkannten Tuberkulosefreiheit erlangen, wovon der letztgenannte Prozentsatz zum 31. Dezember eines jeden Kalenderjahres zu berechnen ist (RICHTLINIE 64/432/EWG). In Deutschland werden noch immer Fälle von Rindertuberkulose festgestellt. Diese wirkten sich allerdings nicht auf den Status der Tuberkulosefreiheit aus (Tabelle 3). Beispielsweise waren am 31.12.2011 in Deutschland

168.916 Rinderbetriebe gemeldet. Mit fünf Rindertuberkulose-Ausbrüchen im Jahr 2011 lag der bundesweite Anteil der Betriebe mit positivem Tuberkulose-Nachweis somit bei ca. 0,003 % (FLI, 2012). In den letzten Jahren werden in Bayern insbesondere im Allgäu wieder verstärkt Ausbrüche von Rindertuberkulose festgestellt (GERSTMAIR, 2011). Eine Neufassung der Tuberkulose-Verordnung ist am 21.07.2013 in Kraft getreten. Darin wurde ein die Fleischuntersuchung ergänzendes Monitoring, wieder über Hauttests, in §2a mit aufgenommen. Es ist festgelegt, dass bundesweit bei über 24 Monate alten weiblichen Rindern bis zum 30.04.2014 eine Stichprobenuntersuchung mittels Simultantest auf Rindertuberkulose durchzuführen ist (RindTbV, 2013).

Tabelle 3: angezeigte Rindertuberkulose-Ausbrüche in Deutschland und Bayern

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012 30.09
Deutschland	4	6	9	10	5	5	12	23	23	11	5	7
Bayern	2	2	1	5	3	2	7	8	18	5	2	3

Datenerfassungszeitraum 2001 bis 30.09.2012; Datenquelle: TSN Abfragedatum: 18.09.2013

Die Rindertuberkulose unterliegt in Deutschland nach §1 der Verordnung über anzeigepflichtige Tierkrankheiten der Anzeigepflicht (TIERSEUCHANZV, 2013). Nach der Nomenklaturänderung von *M. bovis* spp. *caprae* zu *M. caprae* (ARANAZ et al., 2003), wurde *M. caprae* in die Verordnung über anzeigepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung vom 03.11.2004 (gültig ab 10.11.2004) aufgenommen und im Tierseuchennachrichten-System (TSN) getrennt erfasst. Nach der Datenlage im TSN sind im Zeitraum vom 03.11.2004 - 30.09.2013 36 Fälle von Rindertuberkulose als *M. caprae* und 47 als *M. bovis* dokumentiert (Abbildung 2) (TSN, Abfragedatum 18.09.2013). *M. bovis* und *M. caprae* sind demnach in Deutschland zu etwa gleichen Teilen für die Rindertuberkulose verantwortlich. Dabei ist bezüglich des Infektionserregers ein deutliches Nord-Südgefälle zu erkennen. Im Norden von Deutschland wird die Rindertuberkulose hauptsächlich durch *M. bovis* hervorgerufen, dagegen sind im Süden von Deutschland die Fälle überwiegend auf *M. caprae* zurück zuführen (FLI, 2010). Diese Verteilung ist ebenfalls bei humanen Infektionen mit *M. caprae* und *M. bovis* zu erkennen. Über 80 % der humanen Infektionen mit *M. caprae* wurden im Süden von Deutschland dokumentiert (KUBICA et al., 2003). Ferner kann *M. caprae* auch beim Rotwild in der bayerischen Alpenregion nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.4) (GERSTMAIR, 2011).

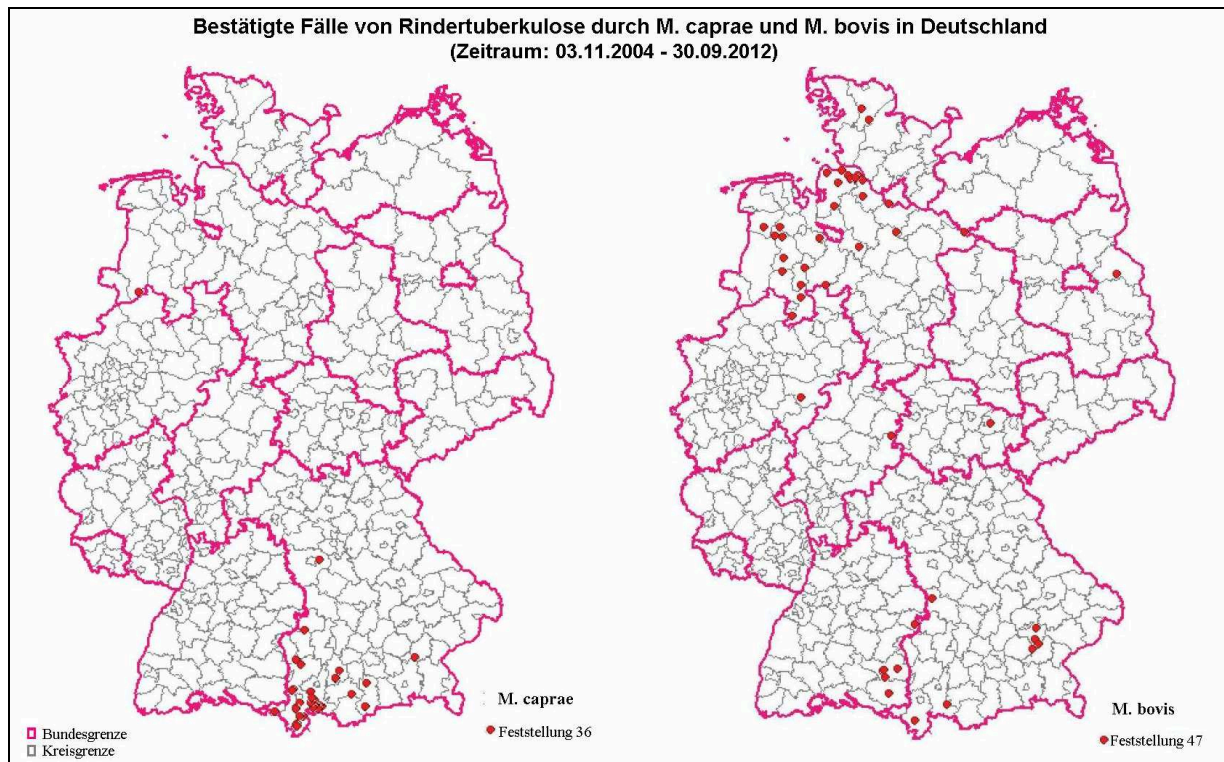


Abbildung 2: geografische Verteilung der Rindertuberkuloseerreger in Deutschland

Datenquelle: TSN, Abfragedatum: 18.09.2013

Kartenmaterial stammt aus TSN 3.0

3.2 Bedeutung der Rindertuberkulose als Zoonose

Tuberkulose ist eine Zoonose und zwischen Mensch und Tier wechselseitig übertragbar. *M. tuberculosis* ist der häufigste Erreger der Tuberkulose des Menschen (RKI, 2013a), jedoch weisen human- wie auch tierpathogene Erreger des MTC im Allgemeinen ein breites Wirtsspektrum auf. Daher ist die Infektion des Menschen auch durch die anderen Mitglieder des MTC möglich (GUTIERREZ et al., 1997; O'REILLY et al., 1995; PRODINGER et al., 2002). Übertragungen von *M. bovis* sowie *M. tuberculosis* vom Menschen auf das Rind sind ebenfalls bekannt (FRITSCHKE et al., 2004; THAKUR et al., 2012).

Das Vorkommen von Rindertuberkulose in der Nutztierhaltung stellt ein sehr lange bestehendes zoonotisches Infektionsrisiko für den Menschen dar. Dies belegt eine Studie, in der *M. bovis* DNA in menschlichen Knochen aus der Eisenzeit, in der bereits Schafe, Ziegen und Rinder als Haustiere gehalten wurden, nachgewiesen werden konnte (TAYLOR et al., 2007a). Eine ernste Gefahr einer Infektion des Menschen mit Rindertuberkulose besteht in Ländern, in denen die Erkrankung bei Rindern weit verbreitet ist (COSIVI et al., 1998). Die

Übertragung der Rindertuberkulose geschieht durch direkten Kontakt von erkrankten Rindern und Menschen. Vor allem die Arbeit in landwirtschaftlichen Betrieben sowie der Konsum von infizierten Lebensmitteln, insbesondere Rohmilch gelten als wichtige Infektionsquellen (MAJOOR et al., 2011; TORRES-GONZALEZ et al., 2013). Bis zur Einführung der Pasteurisierung von Milchprodukten gingen etwa 6 % der Todesfälle durch Tuberkulose in Europa auf *M. bovis* zurück (COLE et al., 2002). Heutzutage gelten die Rinderbestände in Mitteleuropa weitgehend als tuberkulosefrei (MÜLLER et al., 2013). 2011 lag der Anteil der Rindertuberkuloseerreger bei 1,5 % der kulturell positiven humanen Tuberkulosefälle in Deutschland, wobei diese Fälle auch durch Reaktivierungen im Alter, Immunschwäche oder Immigration bedingt sein können (RKI, 2013b). Das momentane Risiko des Menschen sich mit boviner Tuberkulose in Deutschland zu infizieren ist demnach als niedrig einzustufen. Allerdings muss dieses auch individuell betrachtet werden. Denn das Infektionsrisiko hängt von der Erregerkonzentration, Virulenz, Expositionsdauer und -intensität ab (DIEL et al., 2011). Zudem hat der Immunstatus infizierter Personen einen großen Einfluss auf die Manifestation und den klinischen Verlauf einer Tuberkulose. Unter der Voraussetzung einer intakten Immunkompetenz entwickeln ca. 5 - 10 % der mit Tuberkuloseerregern Infizierten eine behandlungsbedürftige Tuberkulose (RKI, 2013a). Kinder, besonders unter fünf Jahren und Immuninkompetente weisen ein höheres Erkrankungsrisiko auf (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; ELWOOD et al., 2005). Unter anderem gelten eine HIV-Infektion, Drogenkonsum und Diabetes als prädisponierende Faktoren für eine Infektion mit klinischer Manifestation (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000).

Für Infektionen des Menschen mit *M. caprae* werden verschiedene Formen der Manifestation beschrieben. Fälle von pulmonaler und extrapulmonaler Tuberkulose traten in Österreich, Deutschland, Spanien, Marokko, Algerien, Israel, Nigeria, Kenia und Peru auf (BLAAS et al., 2003; KUBICA et al., 2003; PRODINGER et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 2009). Lupus vulgaris als häufigste Form der Hauttuberkulose konnte bei Fällen in Süddeutschland und der Türkei auf *M. caprae* zurückgeführt werden. Als Infektionsgründe galten dabei der Konsum von Rohmilch und Rohmilchprodukten sowie der Kontakt zu Rindern (MEYER et al., 2005; TAR et al., 2009). Als Erreger der tuberkulösen Meningitis werden vermehrt *M. tuberculosis* und *M. bovis* beschrieben (KATTI, 2004). Allerdings ist auch ein Fall der tuberkulösen Meningitis eines 80 jährigen Mannes aus Süddeutschland durch *M. caprae* veröffentlicht. Eine Verbindung zur Landwirtschaft bestand für diesen Fall nicht (HANSEN et al., 2012).

3.3 Rindertuberkulose in Österreich

Österreich ist seit 1999 offiziell frei von Rindertuberkulose. Kontrolliert wird der Status gegenwärtig durch Fleischuntersuchungen und Schlachthofkontrollen (SCHOEPF et al., 2012). Allerdings werden seit 1999 in den Regionen Tirol und Vorarlberg immer wieder vereinzelt Tuberkuloseinfektionen mit *M. caprae* bei Rotwild und Rind nachgewiesen (SCHOEPF et al., 2012; PRODINGER et al., 2002; KÖSSLER, 2012). 2008 wurde ein Anstieg von Tuberkulosefällen bei Rindern durch *M. caprae* in Reutte, im Nordwesten von Tirol und um die Ortschaft Steeg festgestellt. Von der österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) wurden daraufhin 143 Rotwildproben auf Tuberkuloseinfektionen in der Jagdsaison 2008/2009 im Bezirk Reutte untersucht. Dabei konnten Gebiete mit einer Prävalenz von 23,1 % (Lechtal I) und 9,7 % (Lechtal Mitte) festgestellt werden (Abbildung 3) (SCHOEPF et al., 2012).

In drei Revieren in der Gemeinde Steeg im Umkreis von zwei Winterfütterungen nördlich des Lechs wird außerdem ein Hotspot mit einer Prävalenz von ca. 40 % Tuberkulose positivem Rotwild beschrieben (KÖSSLER, 2012). Seit 1999 wird durch Genotypisierung im MIRU-VNTR (MIRU = mycobacterial interspersed repetitive unit; VNTR = variable number of tandem repeats) und Spoligotyping im österreichischen oberen Lechtal in der Rinder- und Rotwildpopulation nur ein identischer Genotyp von *M. caprae* nachgewiesen (PRODINGER et al., 2002; KÖSSLER, 2012; SCHOEPF et al., 2012). Im MIRU-VNTR treten lediglich geringfügige Variationen in drei Loci von neun Isolaten auf (SCHOEPF et al., 2012). Dieser Genotyp ist somit seit über zehn Jahren genetisch stabil. Demzufolge wird in diesem Gebiet der Rotwildbestand als Erregerreservoir für die Tuberkulose bei Nutz- und Wildtieren angesehen (KÖSSLER, 2012; SCHOEPF et al., 2012). Der für lange Zeit unerkannte Tuberkulosestatus in der Wildtierpopulation ist auf das Fehlen von gezielter Wildtierüberwachung zurückzuführen (SCHOEPF et al., 2012).

70 Kilometer weiter östlich vom Lechtal wurden im Nationalpark-Karwendel, zwischen Bayern und Tirol liegend, in den Jahren 1999 - 2000 vier *M. caprae* Infektionen beim Rotwild auf österreichischem Gebiet nachgewiesen. Diese Isolate weisen im Spoligotyping untereinander den gleichen Genotyp auf. Allerdings unterscheidet sich dieser Genotyp von dem der *M.-caprae*-Isolate aus dem Lechtal und konnte zudem bis heute nicht bei Infektionen von Rindern in Österreich nachgewiesen werden (PRODINGER et al., 2002).

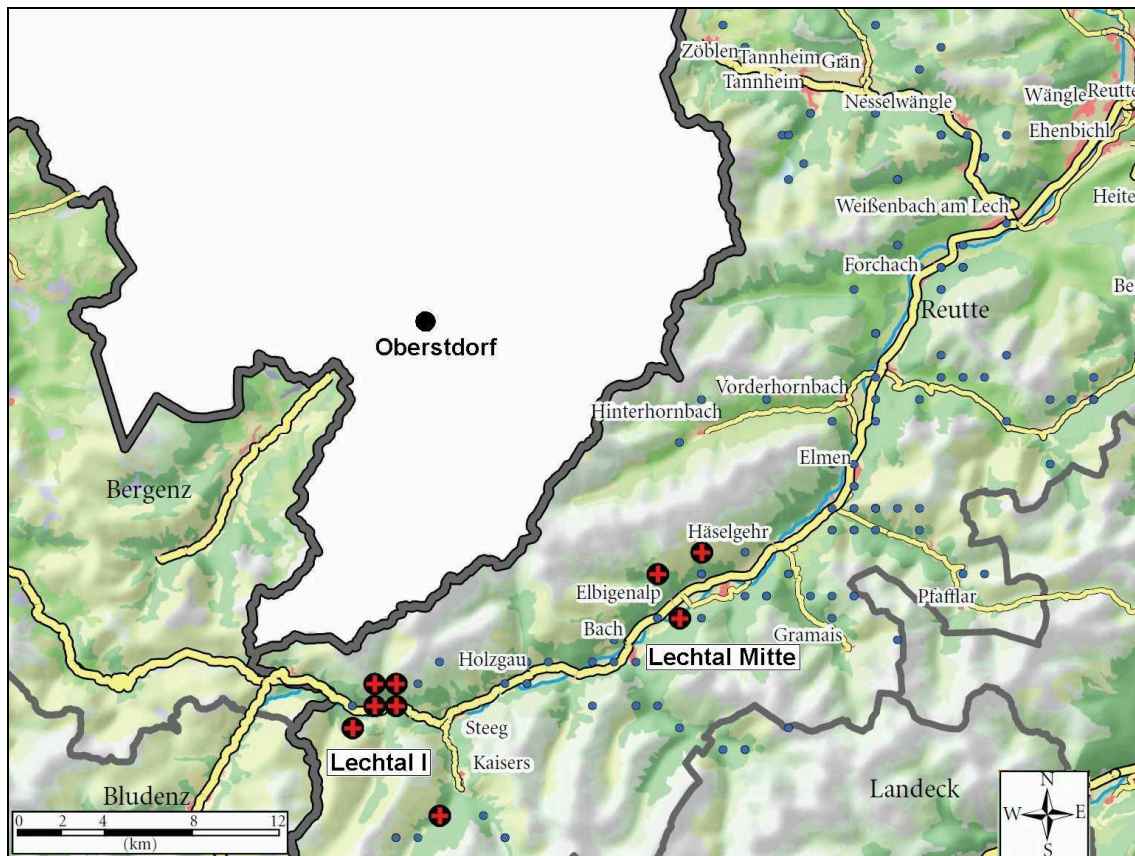


Abbildung 3: geografische Verteilung von *M. caprae*-positiven Hirschen in Reutte, Österreich.

Kultur negative Proben: ● Kultur positive Proben: ⊕

Positive Tiere wurden im "Lechtal I" und "Lechtal Mitte" detektiert.

modifiziert aus SCHOEPP et al., 2012

3.4 Tuberkulose bei Wildtieren

In einigen Ländern stellt die Rindertuberkulose weiterhin ein Problem dar, insbesondere wenn ein Wildtierreservoir besteht und eine Übertragung zwischen Nutz- und Wildtieren auf offenen Weiden oder Almen erfolgen kann (JENKINS et al., 2008). Allerdings ist der alleinige Nachweis einer Infektion in einer Wildtierpopulation kein Beweis für ein bestehendes Reservoir. Die Bezeichnung Reservoir setzt dabei voraus, dass sich eine Infektion eigenständig in der jeweiligen Population aufrechterhalten kann. Als Überträger (spillover host) gilt dagegen, wenn sich der Erreger nur über eine bestimmte Zeit in der Population hält und für ein Fortbestehen der Infektion ein erneuter Erregereintrag von außen nötig ist (CORNER et al., 2006). Für *M. bovis* sind bereits der Dachs (*Meles meles*) im United Kingdom (JENKINS et al., 2008), der Fuchskusu (*Trichosurus vulpecula*) in Neuseeland (RYAN et al., 2006) und der

Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) in Michigan, USA (CONNER et al., 2008) als Wildtierreservoir definiert (O'BRIEN et al., 2011). Für *M. caprae* ist das Rotwild in Österreich als Wildtierreservoir beschrieben (siehe Abschnitt 3.3) (KÖSSLER, 2012). Auch wenn sowohl von einem Reservoir wie auch Überträger eine Infektionsgefahr für Nutztiere ausgeht, ist die genaue Rolle von Wildtieren in einer Infektkette zu klären. Denn eine effektive Kontrolle ist nur möglich, wenn die richtige Infektionsquelle bekämpft wird (CORNER et al., 2006). Durch Differenzierungen der *M.-caprae*- und *M.-bovis*-Isolate unterhalb der Speziesebene werden bereits Zusammenhänge zwischen Nutz- und Wildtierinfektionen belegt (DE LISLE et al., 2001; DUARTE et al., 2008; PRODINGER et al., 2002; PRODINGER et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2010).

In Europa werden *M. caprae* Infektionen bei Wild- und Nutztieren hauptsächlich in West- und Mittel-Europa dokumentiert (Tabelle 4). Im Alpenraum werden bei Rind und Rotwild identische Genotypen von *M.-caprae*-Isolaten nachgewiesen. Daher steht die hypothetische Übertragung des Erregers zwischen Rotwild und Rind in dieser Region immer wieder zur Diskussion (BONIOTTI et al. 2009; GAVIN et al., 2009; PRODINGER et al., 2005). Demzufolge werden seit 2009 verschiedene Wildtier-Monitoring-Programme durchgeführt: Durch ein Monitoring-Projekt im Zeitraum von 2009 - 2011 konnte in der bayerischen Alpenregion beim Rotwild *M. caprae* mit einer Prävalenz von 1,1 % im Oberallgäu und 2,1 % im Karwendel-Gebiet (Landkreis Bad-Tölz/Wolfratshausen) nachgewiesen werden (GERSTMAIR, 2011).

2011 - 2013 wurde zwischen den Alpenländern Deutschland, Schweiz, Österreich und Italien das EMIDA (Emerging and Major Infectious Diseases of Livestock) ERA-Net Projekt "TB-Alpine-Wildlife" durchgeführt. In diesem Projekt wurde die Verbreitung von Tuberkuloseinfektionen bei Wildtieren mit dem Schwerpunkt Rotwild untersucht, um eine mögliche Infektionsgefahr ausgehend von der alpinen Wildtierpopulation beurteilen zu können (<http://tb-alpine-wildlife.org/>).

Mit Beginn des Jahres 2013 ging dieses Projekt initiiert durch das bayerische Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit (StMUG) über in ein bayerisches Tuberkulose-Rotwild-Monitoring entlang der gesamten bayerischen Alpenkette (LGL, 2013).

Tabelle 4: Quellen zum Nachweis von *M. caprae* bei Nutz- und Wildtieren in Europa

Land	Wildtier	Nutztier	Referenz
Spanien	Wildschwein (<i>Suis scrofa</i>)	Ziege (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	RODRÌGUEZ et al., 2011
	Rotwild (<i>Cervus elaphus</i>)	Schaf (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	
	Fuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	Schwein (<i>Sus scrofa domestica</i>)	
		Rind (<i>Bos taurus</i>)	
Portugal	Wildschwein (<i>Suis scrofa</i>)	Rind (<i>Bos taurus</i>)	CUNHA et al., 2011
	Rotwild (<i>Cervus elaphus</i>)	Ziege (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	
Frankreich		Ziege (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	HADDAD et al., 2001
Österreich	Rotwild (<i>Cervus elaphus</i>)	Rind (<i>Bos taurus</i>)	PRODINGER et al., 2002
Deutschland	Rotwild (<i>Cervus elaphus</i>)	Rind (<i>Bos taurus</i>)	KUBICA et al., 2003
			GERSTMAIR, 2011
Italien		Rind (<i>Bos taurus</i>)	BONIOTTI et al., 2009
Ungarn	Wildschwein (<i>Suis scrofa</i>)	Rind (<i>Bos taurus</i>)	JÁNOSI et al., 2009
	Rotwild (<i>Cervus elaphus</i>)		
	Damwild (<i>Dama dama</i>)		
Kroatien		Rind (<i>Bos taurus</i>)	ERLER et al., 2004
Tschechien		Rind (<i>Bos taurus</i>)	PAVLIK et al., 2002
		Farmwild	

Es gilt zu beachten, dass *M. caprae* erst 2003 als eigene Spezies im MTC definiert wurde (ARANAZ et al., 2003).

4 Diagnostik der Rindertuberkulose

4.1 Klinische Untersuchung

Bei einer Tuberkuloseinfektion können die Wirte über lange Zeit klinisch unauffällig sein. Zudem äußert sich die Erkrankung in unspezifischen klinischen Veränderungen wie Leistungsrückgang unklarer Genese, Abmagerung oder chronisch therapieresistenter Husten (FLI, 2010).

4.2 Pathologisch-anatomische Untersuchung

Pathologische Veränderungen sind meist an der Eintrittspforte der Infektion lokalisiert. Dies betrifft beim Rind hauptsächlich den Respirations- oder Gastrointestinaltrakt, sowie die regionalen Lymphknoten (GORMLEY et al., 2006; MCCORRY et al., 2005). Rindertuberkulose kann demnach aufgrund von auffälligen Schlachtbefunden im Rahmen der Schlacht tier- und Fleischuntersuchung detektiert werden. Allerdings gilt dies nur für fortgeschrittene Krankheitsstadien. Kleine Granulome befinden sich meist in Lymphknoten und Organen, die nicht immer routinemäßig oder sorgfältig genug untersucht werden. Zudem sind die kleinen Veränderungen mit dem Auge oft kaum wahrnehmbar (VORDERMEIER et al., 2008). Die Entwicklung von sichtbaren Läsionen ist eine Folge der Immunantwort auf die Gewebeeinvasion der Erreger. Makroskopisch sichtbare Infiltrationen von Immunzellen (Granulombildung) sind meist erst in den späten Stadien des Krankheitsverlaufes erkennbar. Kritisch sind Tiere, die sich im Anfangsstadium der Infektion befinden oder eine chronisch rezidivierende Tuberkulose aufweisen. Bei diesen Tieren werden häufig keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen vorgefunden (GORMLEY et al., 2006). Tuberkuloseinfektionen dieser Art werden als Tuberkulose mit nicht sichtbaren Läsionen (non visible lesions, NVL) bezeichnet (VORDERMEIER et al., 2008).

4.3 Intrakutan-Test

Bei dem Intrakutan-Test wird durch eine intrakutane Applikation von Tuberkulin bei einer vorausgegangenen Infektion mit Mykobakterien eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ ausgelöst (WOOD et al., 1990). Der Nachweis einer spezifischen T-Zell-Immunität erfolgt dabei durch eine lokalisierte Reaktion in der Haut an der Injektionsstelle mit Hautverdickung, Schmerzempfindlichkeit und vermehrter Wärme (OIE, 2009). Generell kann der Intrakutan-Test auf unterschiedliche Weisen angewendet werden (SCHILLER et al., 2010). Für Deutschland ist die Durchführung und Auswertung im Anhang B der Richtlinie 64/432/EWG in der aktuell gültigen Fassung vorgeschrieben. Ein hochgereinigtes Tuberkulin stellt das PPD (purified protein derivate) dar. Für den Intrakutan-Test kann bovines und auch zusätzlich aviäres PPD aus den Überständen von *M.-bovis*- bzw. *M.-avium*-Kulturen verwendet werden. Für den sogenannten Intrakutan-Monotest wird allein bovines PPD verwendet. Die Hautdickenzunahme soll vor und 72 Stunden nach der Injektion gemessen werden. Als negativ ist der Intrakutan-Monotest zu bewerten, wenn die Hautdickenzunahme unter 2 mm liegt und

keine klinischen Veränderungen, wie zum Beispiel Ödeme, Schorf oder Schmerzempfinden an der Injektionsstelle zu beobachten sind. Ein zweifelhaftes Ergebnis besteht, wenn eine Hautdickenzunahme zwischen 2 - 4 mm und keine klinischen Veränderungen vorliegen. Beim Auftreten von klinischen Veränderungen oder einer Dickenzunahme der Haut über 4 mm, ist der Test als positiv zu bewerten (RICHTLINIE 64/432/EWG). Wegen der im bovinen PPD enthaltenden kreuzreaktiven Antigene kann jedoch auch eine Reaktion nach vorangegangener Infektion mit NTM (MEDEIROS et al., 2010; SCHILLER et al., 2010) oder *M. bovis* BCG erfolgen (OIE, 2009). Zur Abklärung möglicher Kreuzreaktionen mit NTM-Erregern kann der Tuberkulin-Hauttest auch als Simultantest durchgeführt werden. Bei diesem wird neben dem bovinen PPD auch aviäres PPD zusätzlich intrakutan appliziert (OIE, 2009). Dabei kann durch eine parallele Infektion mit NTM- und MTC-Erregern der Nachweis von Rindertuberkulose erschwert beziehungsweise maskiert werden (THOM et al., 2008).

Des Weiteren ist eine exakte Durchführung für das Ergebnis des Intrakutan-Tests entscheidend. Um Applikationsfehler zu vermeiden, sollte eine korrekte intrakutane Injektion durch Palpation überprüft werden. Außerdem sollte die Hautdicke vor und 72 Stunden nach der Injektion von der gleichen Person gemessen werden (OIE, 2009).

4.4 Interferon-Gamma (IFN- γ)-Test

Das Prinzip des IFN- γ -Test beruht auf dem Nachweis von IFN- γ , welches von spezifisch T-Lymphozyten sezerniert wird, die durch einen vorausgegangenen Kontakt mit Tuberkuloseerregern sensibilisiert wurden. Um eine ausreichende IFN- γ Ausschüttung zu erreichen muss eine in vitro Re-Stimulation des Blutes mit bakteriellem Antigen erfolgen. Durch einen anschließenden ELISA wird die Menge des freigesetzten IFN- γ gemessen (OIE, 2009; WOOD et al., 1990).

Der in vielen Ländern in Rindertuberkulose-Kontrollprogrammen verwendete kommerzielle IFN- γ -Test ist der BOVIGAM[®] IFN- γ Test der Firma Prionics (VORDERMEIER et al., 2008; SCHILLER et al., 2010). Bei diesem Test erfolgt eine Stimulation der T-Lymphozyten in einer Vollblutprobe mit bovinen PPD und zum Ausschluss einer Kreuzreaktion zusätzlich mit aviärem PPD. Nach vorhergegangenen Kontakt zu NTM können allerdings fragliche oder falsch positive Ergebnisse auftreten (BEZOS et al., 2010). Da in Deutschland regional eine starke Paratuberkulose Verbreitung in Rinderbeständen bestehen kann, ist die Spezifität dieses Tests von besonderer Bedeutung (FLI, 2010). Ferner gilt es die Zirkulationsdynamik der T-Lymphozytenpopulation, zu beachten, da nicht zu jedem Zeitpunkt einer Blutentnahme

gleich viele spezifisch T-Lymphozyten im Blut vorhanden sind (WESTERMANN & PAPST, 1992).

Für die Humanmedizin ist in Deutschland als vergleichbarer Test der QuantiFERON-TB® Gold In-Tube der Firma Cellestis kommerziell erhältlich (DIEL et al., 2011). Die Stimulation erfolgt bei diesem Test mit den synthetischen *M. tuberculosis*-spezifischen Peptiden ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target), CFP-10 (10 kDa culture filtrate protein) und TB7.7 (Rv2654c, mögliches phiRv2 Phagen Protein) (ARLEHAMN et al., 2012; BROSCHE et al., 2002). Diese Peptide fehlen den meisten NTM außer *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* und *M. riyadhense* (VAN INGEN et al., 2009). Des Weiteren sind ESAT-6 und CFP-10 in der RD1-Region codiert, die im Genom von *M. bovis* BCG deletiert ist (siehe Abschnitt 2.3) (PYM et al., 2002). Demnach stellen diese Peptide sogenannte DIVA (differentiation of infected from vaccinated animals) Antigene dar und könnten eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen infizierten und geimpften Tieren bieten (OIE, 2009).

Für den IFN- γ -Test gilt eine sensitivere Detektion von Früherkrankungen als für den Intrakutan-Test (BEZOS et al., 2010; GORMLEY et al., 2006). In Kombination mit dem Intrakutan-Monotest ist eine Sensitivität von 95,2 % beschrieben (GORMLEY et al., 2006).

Die zellvermittelte Immunantwort gilt als die erste feststellbare Immunantwort nach einer Infektion mit Rindertuberkuloseerregern. Daher können auch subklinische Infektionen nachgewiesen werden. Infolgedessen werden der Intrakutan- und IFN- γ -Test als ein wesentliches Diagnostikverfahren bei der Rindertuberkulose eingesetzt. Allerdings besteht keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen einer chronisch persistenten und akuten Tuberkulose (VORDERMEIER et al., 2008). Des Weiteren sind durch die Abhängigkeit von der zellvermittelten Immunantwort auch falsch-negative Ergebnisse möglich. Zum einen können sich Tiere in einem sehr frühen Stadium der Infektion befinden und noch keine ausreichende zellvermittelte Immunantwort aufweisen (GORMLEY et al., 2006). Zum anderen kann aufgrund des Zusammenbruchs der zellulären Immunantwort in der Spätphase der Erkrankung ein falsch-negatives Ergebnis entstehen (MEDEIROS et al., 2010).

4.5 Serologisch-diagnostische Nachweisverfahren

Der Nachweis einer zellvermittelten Immunreaktion beispielsweise auf PPD korreliert zwar mit einer Mykobakterieninfektion jedoch nicht mit der Manifestation der Tuberkulose. Dagegen stehen Antikörperreaktionen mit der Antigenbelastung und der mykobakteriell verursachten Pathologie im Zusammenhang. In der Regel werden Antikörper erst spät nach der

Mykobakterieninfektion gebildet (WATERS et al., 2011). Zudem ist die Antikörperbildung individuell sehr verschieden und reicht von gut messbarer bis zu fehlender Nachweisbarkeit. Somit stellt sie im Gegensatz zur T-Zellreaktion kein zuverlässiges diagnostisches Kriterium dar. Über Antikörpernachweise könnte man jedoch im Gegensatz zur zellvermittelten Immunantwort zwischen einer akuten und chronisch persistierenden Tuberkulose unterscheiden. Des Weiteren können Antikörper durch einfache und schnelle Methoden, wie ELISA, detektiert werden. Allerdings sind Versuche zur Entwicklung von serologisch-diagnostischen Tests auch in der Humanmedizin bis heute erfolglos (ACHKAR et al., 2012).

4.6 Mikroskopischer Nachweis

Die mikroskopische Untersuchung stellt ein einfaches und schnelles Verfahren dar, um säurefeste Bakterien nachzuweisen (NEUMEISTER et al., 1992). Sie kann direkt aus einem Abstrich der Gewebeprobe durchgeführt werden (SMITHWICK, 1976). Allerdings weist die Mikroskopie nur eine geringe Sensitivität und Spezifität auf. Eine Differenzierung zwischen dem MTC, NTM und anderen stäbchenförmigen säurefesten Erregern wie z.B. *Norcardia* oder *Rhodococcus* ist nicht möglich (NEUMEISTER et al., 1992). Die gebräuchlichsten Methoden sind die Färbung nach Ziehl-Neelsen (COOK, 1997) oder die Fluoreszenzmikroskopie mittels Auramin-Färbung (NEUMEISTER et al., 1992).

4.7 Kultureller Nachweis

Der kulturelle Erregernachweis von Mykobakterien gilt nach wie vor als Goldstandard in der Tuberkulosedagnostik (NEUMEISTER et al., 1992; VORDERMEIER et al., 2008). Flüssigmedien ermöglichen ein schnelleres Wachstum von Mykobakterien als Festmedien. Jedoch ist bei der Verwendung von Flüssigmedien die Kontaminationsrate erhöht. Somit bietet die Kombination aus Flüssig- und Festmedien die Möglichkeit einer sicheren und sensitiveren Detektion von Mykobakterien (NEUMEISTER et al., 1992). Gebräuchliche Nährmedien, die in der durch das nationale veterinärmedizinische Referenzlabor für Tuberkulose des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) veröffentlichten amtlichen Methodensammlung empfohlen werden, sind die Festnährböden Löwenstein-Jensen und Stonebrink und die Flüssigmedien Middlebrook und Kirchner (FLI, 2013).

Allerdings handelt es sich bei der kulturellen Anzucht wegen der langen Generationszeit der Mykobakterien (16 - 20 Stunden), um eine sehr langwierige Methode. Um einer Kontamination der Nährmedien durch die schnellwachsende Begleitflora im Probenmaterial vorzubeugen,

wird eine Dekontamination des Untersuchungsmaterials mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH durchgeführt (FLI, 2013; RKI, 2013a). Infolge der langen Diagnostikdauer ist die Kultur ungeeignet für die Routinediagnostik von verdächtigen Schlachthofproben (FLI, 2010). Außerdem ist der Nachweis von mykobakteriellen Erregern abhängig von der Präsenz oder Absenz von sichtbaren Läsionen in dem Gewebematerial, das für die Kultur verwendet wird. Gewebeproben mit NVL weisen lediglich eine Detektionsrate von 5 - 6 % auf, wohingegen für Gewebe mit sichtbaren Läsionen 95 - 96 % angegeben werden (VORDERMEIER et al., 2008).

4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird zum schnellen MTC-Erregernachweis direkt aus dem Untersuchungsmaterial verwendet. In Deutschland wird in der Amtlichen Methodensammlung eine duplex real-time PCR für die Detektion von MTC-DNA empfohlen. Diese stützt sich auf den dualen Nachweis zweier Genorte (FLI, 2013): zum einem auf eine Fragmentsequenz aus der hypothetischen Helikase (HELI) (RODRÍGUEZ et al., 1995) und zum anderen aus dem Insertionselement (IS) IS1081. IS1081 stellt ein repetitives Element im mykobakteriellen Genom dar und liegt in den meisten MTC-Isolaten in sechs Kopien vor (TAYLOR et al., 2007b). Prinzipiell ist die MTC-PCR wie folgt auszuwerten. Ein positives Ergebnis liegt nur beim Nachweis der Nukleotidsequenzen aus beiden Genorten vor. Bei der Detektion nur eines der beiden Zielfragmente erhält man ein fragliches Ergebnis. Als interne Kontrolle der PCR muss zusätzlich zu den beiden MTC-Genfragmenten Beta-Aktin aus dem Gewebematerial nachgewiesen werden (FLI, 2013; TOUSSAINT et al., 2007). Die analytische Sensitivität der PCR für *M. bovis* DNA liegt bei fünf Fentogramm (FLI, 2010). Für den mykobakteriellen DNA-Nachweis wird eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 73 % aus tuberkuloseverdächtigen Geweben angegeben (KÖHLER, 2010).

Allerdings beeinflusst das ungleichmäßige Vorkommen von Mykobakterien in größeren Gewebemengen insbesondere bei NVLs die Trefferwahrscheinlichkeit bei der Zufallsauswahl des Gewebematerials (STEWART et al., 2013). Zu beachten ist weiterhin, dass neben einem sensitiven und spezifischen PCR-System auch die vorangehende Extraktionsmethode sehr entscheidend für einen sicheren Nachweis der mykobakteriellen DNA ist. Die Mykobakterien sind durch die charakteristische Peptidoglykan-Schicht relativ resistent gegenüber Lysis-Puffern und somit ist die Freisetzung der DNA im Gegensatz zu anderen Bakterien erschwert (HOSEK et al., 2006).

Möglichkeiten zur Verbesserung der Lyse stellen eine mechanische Homogenisierung des Probenmaterials, sowie thermische und enzymatische Verfahren dar (BOSE et al., 1993; HURLEY et al., 1987; ODUMERU et al., 2001).

5 Möglichkeiten zur Differenzierung des MTC

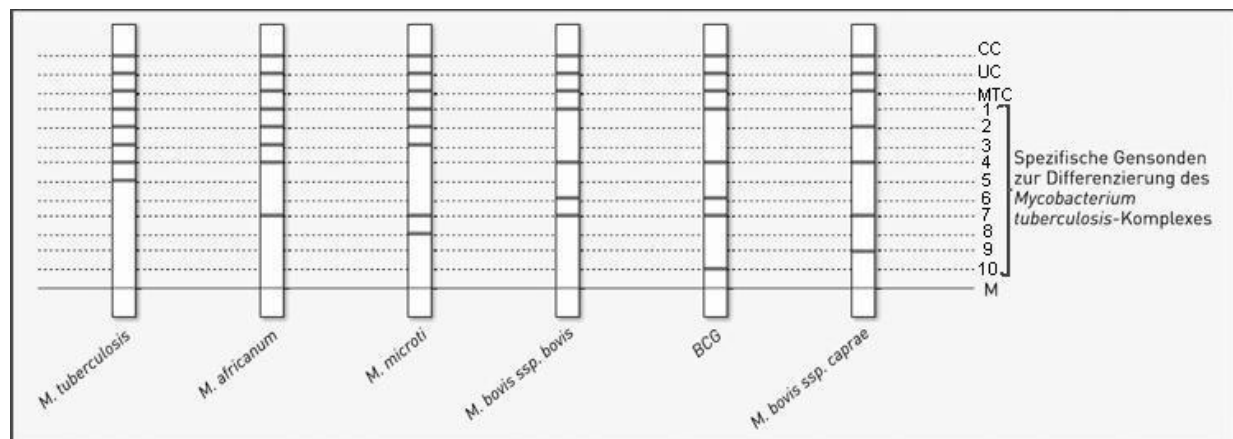


Abbildung 4: speziesspezifisches Bandenmuster des GenoType® MTBC

CC: Konjugatkontrolle

UC: Amplifikationskontrolle (23S rRNA)

MTC: spezifische Sonde für die Erreger des MTC (23S rRNA)

Positionen der MTC-Spezies spezifischen Oligonukleotide (1-10):

- speziesspezifische SNPs im *gyrB* Gen (1-9)
- *M. bovis* BCG spezifische RD1-Deletion (10)

M: Markierungslinie zur korrekten Ausrichtung der Streifen

modifizierte Grafik basierend auf den Herstellerangaben von Hain Lifescience GmbH

5.1 GenoType® MTBC

Die Identifizierung von Tuberkulosebakterien kann anhand von Streifenhybridisierungstests erfolgen. Diese beruhen auf einer PCR-Amplifikation und einer anschließenden Sonden-Hybridisierung mit den erhaltenden PCR-Fragmenten (NEUMEISTER et al., 1992). Ein kommerziell erhältlicher DNA-Strip Test ist der GenoType® MTBC von Hain Lifescience GmbH. Durch diesen können *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* und *M. bovis* BCG differenziert werden. Als Ausgangsmaterial können Fest- und Flüssigkulturen verwendet werden (RICHTER et al., 2003). Der Test basiert auf der Detektion der 23S rRNA, des Sequenzpolymorphismus im Gen der *gyrB* und der RD1-Deletion (KASAI et al., 2000; NIEMANN et al., 2000; RICHTER et al., 2003; TALBOT et al., 1997). Das amplifizierte Fragment des 23S rRNA Gens dient sowohl als Amplifikationskontrolle für

G/C-reiche, gram-positive Bakterien (Amplifikationskontrolle) sowie als spezifische Sonde für Mitglieder des MTC. Zur Differenzierung der MTC-Spezies werden SNPs im *gyrB* Gen (siehe Abschnitt 2.2) und die Deletion in der RD1-Region verwendet. Die Sequenzabschnitte werden in einer multiplex PCR amplifiziert. Anschließend hybridisieren die Amplifikate mit spezifischen Oligonukleotidsonden, die an einer in Streifen geschnittenen Membran gebunden sind und die charakteristischen SNPs und Sequenzen aufweisen (Abbildung 4) (RICHTER et al., 2003).

5.2 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Die Analyse des RFLP stellt die frühere Standardtechnik des DNA-Fingerprintings dar. Mutationen innerhalb von Restriktionsstellen von Restriktionsenzymen verändern die Länge der entstehenden Fragmente (NEUMEISTER et al., 1992). Nach einer Auftrennung mittels Elektrophorese und Hybridisierung werden die gesuchten Fragmente autoradiografisch sichtbar gemacht (BERG et al., 2003). Als Zielregionen werden meist Gene, die in mehreren Kopien vorkommen oder repetitive DNA-Sequenzen verwendet (NEUMEISTER et al., 1992). Für den MTC wird die Insertionssequenz IS6110 (IS6110-RFLP) genutzt. Diese ermöglicht eine Differenzierung der MTC-Spezies wie auch eine begrenzte Unterscheidung innerhalb der Spezies (SKUCE et al., 1994; VAN EMBDEN et al., 1993). In dem Genom von *M. bovis* liegen allerdings nur eine bis fünf Kopien von IS6110 vor (VAN SOOLINGEN et al., 1991). Deswegen werden für diese Spezies andere Regionen wie die DR-Region (direct repeat, DR) verwendet (COUSINS et al., 1998; VAN SOOLINGEN et al., 1994). Ferner sind die Ergebnisse schlecht reproduzierbar und schwer zu benennen, so dass Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren nicht verglichen werden können. Zudem haben PCR basierende Methoden die kostspielige und zeitaufwendige Differenzierung durch das IS6110-RFLP mittlerweile ersetzt (PRODINGER et al., 2005).

5.3 Differenzierung durch Spoligotyping

Für die Methode des Spoligotyping wird ein Polymorphismus in der chromosomalen DR-Region verwendet (KAMERBEEK et al., 1997), der nur für das Genom der Mitglieder des MTC beschrieben ist (GROENEN et al., 1993; HERMANS et al., 1991). Die DR-Region enthält viele konservierte 36 bp umfassende aufeinanderfolgende Wiederholungen (direct repeats, DRs). Zwischen den DRs liegen über 60 Spacer (HERMANS et al., 1991). 43 verschiedene, sich nicht wiederholende (non repetitive) Spacer-Sequenzen wurden für eine

internationale Standardisierung des Spoligotypings bestimmt (KAMERBEEK et al., 1997; SMITH & UPTON, 2012) (Abbildung 5A). Das Vorhandensein oder Fehlen dieser Spacer in der DR-Region ermöglicht die Differenzierung des MTC auf Spezies- und Subspeziesebene (GROENEN et al., 1993). Der Polymorphismus besteht demnach aus der unterschiedlichen Anzahl der vorhandenen Spacer in der DR-Region. Die konservierte Sequenz der DRs wird als Target für eine Amplifikation der Spacer-Sequenzen verwendet (GROENEN et al., 1993; KAMERBEEK et al., 1997) (Abbildung 5B). Die Amplifikate werden auf eine Membran gegeben, an der 43 synthetische Oligonukleotide aus der Sequenz der jeweiligen Spacer gebunden sind. Somit steht Spoligotyping für "Spacer Oligonucleotide Typing".

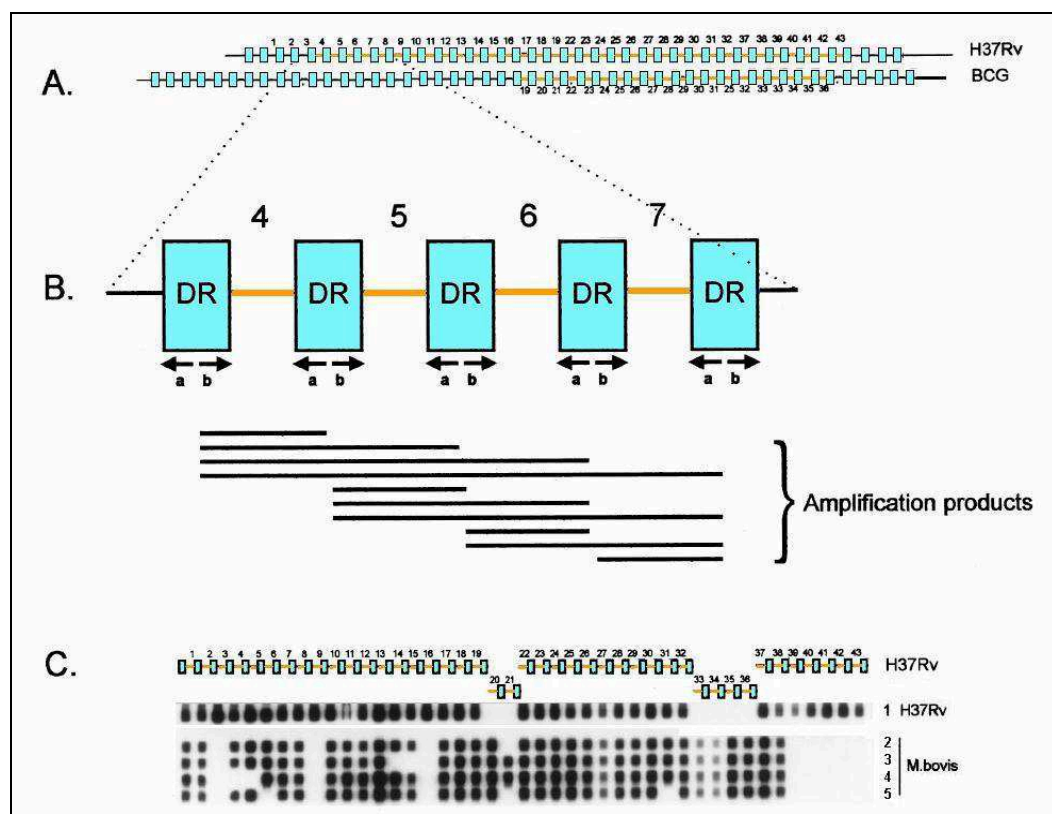


Abbildung 5: schematische Darstellung des Spoligotyping

DR (direct repeat): verwendete Spacer:

A: Aufbau der DR-Region im Genom von *M. tuberculosis* H37RV und *M. bovis* BCG.

Die im Genom enthaltenden DRs sind jeweils unterbrochen von Spacern mit einer Länge von 35 - 41 bp.

B: Prinzip der Amplifikation der DR-Region mittels PCR. Da die DR-spezifischen Primer an jede DR-Sequenz binden, entstehen PCR-Fragmente von unterschiedlicher Länge.

C: verschiedene Hybridisationsmuster von *M. tuberculosis* H37RV und vier *M.-bovis*-Isolaten

modifiziert aus KAMERBEEK et al., 1997

Die Detektion der Spot-Hybridisierung erfolgt durch Chemilumineszenz. Als Ergebnis wird für jeden Spacer ein positiv/negativ Ergebnis erhalten (Abbildung 5C). Dieses wird als 43-stelliger Code dargestellt. In dieser Form ist es möglich, die Ergebnisse einfach unter verschiedenen Laboren zu kommunizieren und zu vergleichen (KAMERBEEK et al., 1997).

Jede Spezies des MTC weist einen charakteristischen Code auf, der innerhalb festgelegter Grenzen auch speziesspezifische Variationen enthalten kann. Somit stellt das Spoligotyping eine Methode für die Differenzierung der Spezies und auch innerhalb der Spezies dar (KAMERBEEK et al., 1997; PRODINGER et al., 2002). Beispielsweise sind für die Spezies *M. caprae* die fehlenden Spacer 1, 3 - 16, 30 - 33 und 39 - 43 charakteristisch (ARANAZ et al., 2003). Allerdings sind die Differenzierungsmöglichkeiten unterhalb der Speziesebene aufgrund der relativ gut konservierten DR-Region begrenzt (GOGUET DE LA SALMONIÈRE et al., 1997; PRODINGER et al. 2005). In der Spoligotype Datenbank (www.mbovis.org) können die Codes für alle Mitglieder des MTC mit einer RD9-Deletion eingegeben und den bereits eingetragenen Typen zugeordnet werden. Jeder einzigartige Code wird durch "SB" und einer Kombination aus vier Zahlen benannt. Zudem sind in der Datenbank Informationen zur geografischen Verbreitung der eingestellten Typen hinterlegt, sodass globale Vergleichsuntersuchungen möglich sind (SMITH & UPTON, 2012).

5.4 Differenzierung durch MIRU-VNTR

Bei der Methodik der MIRU-VNTR-Typisierung (MIRU = mycobacterial interspersed repetitive unit; VNTR = variable number of tandem repeats) werden je nach Durchführung bis zu 25 verschiedene Genorte (Loci), die über das gesamte Genom verteilt vorkommen können, analysiert. In jedem dieser Loci ist eine variable Anzahl von sich hintereinander wiederholenden Sequenzen (VNTR) enthalten. Dabei kann eine einzelne repetitive Sequenz eine Länge bis zu 100 bp aufweisen (FROTHINGHAM et al., 1998; MAZARS et al., 2001). Sequenzierungen der Loci zeigen, dass nur einzelne einfache Sequenzänderungen oder Deletionen von genau der exakten Größe der VNTR in den Loci vorliegen. Somit kann durch die Größe eines Locus auf die exakte Anzahl der VNTRs geschlossen werden (Abbildung 6) (FROTHINGHAM et al., 1998; SUPPLY et al., 2000). Die Typisierung anhand eines einzelnen VNTR-Locus ist für eine Speziesdifferenzierung meist nicht ausreichend diskriminierend. Deswegen werden mehrere VNTR-Loci gleichzeitig analysiert (NEUMEISTER et al., 1992). Für den MTC sind verschiedene VNTRs beschrieben. Darüber hinaus sind zwölf für Mykobakterien spezielle VNTRs, sogenannte MIRUs publiziert (MAGDALENA et al., 1998;

SUPPLY et al., 1997). Supply et al. empfehlen ein 24-Loci-Set mit einer hohen Differenzierungsfähigkeit (SUPPLY et al., 2006). In einzeln durchgeführten PCR-Ansätzen wird jeweils der gesamte Locus durch ein flankierendes Primer-Paar amplifiziert. Die Präsenz und Größe von jedem Locus wird anschließend durch Elektrophorese im Agarosegel bestimmt. Das Ergebnis wird in einem Zahlencode dargestellt. Dabei wird jedem untersuchten Locus die Kopienanzahl der MIRUs beziehungsweise VNTRs zugeordnet (MAZARS et al., 2001). Durch diesen Code können die Spezies und Subspezies des MTC voneinander unterschieden werden (SOLA et al., 2003; SUPPLY et al., 2001). Die MIRU-VNTR-Typisierung ermöglicht dabei eine genauere Differenzierung unterhalb der Speziesebene als das Spoligotyping und das IS6110-RFLP. Für *M. caprae* wurde die MIRU-VNTR-Typisierung anhand von 232 *M.-caprae*-Isolaten erfolgreich durchgeführt (PRODINGER et al., 2005).

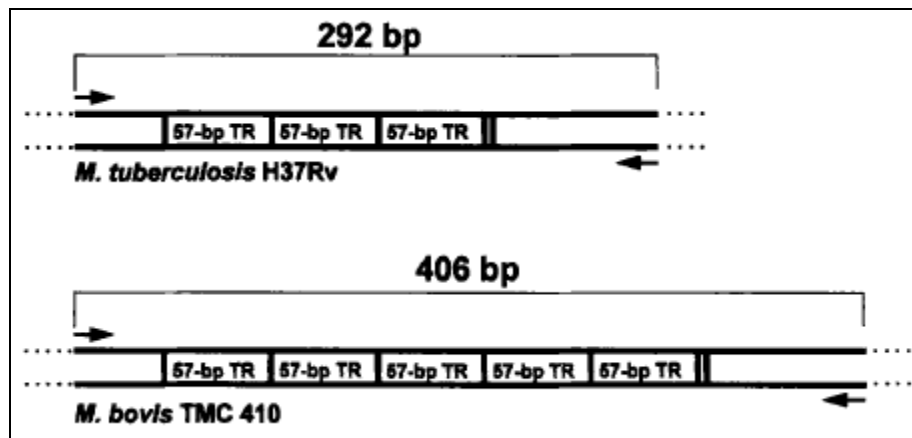


Abbildung 6: Beispiel für einen VNTR-Locus

Abgebildet ist der VNTR-Locus ETR-B (exact tandem repeat) für *M. tuberculosis* H37Rv und *M. bovis* TMC410.

Der Locus wird durch flankierende Primer (schwarze Pfeile) amplifiziert. Dabei weisen die PCR-Fragmente der beiden Stämme zwei unterschiedliche Größen auf. Sequenzierungen zeigen, dass *M. tuberculosis* H37Rv bei einer Größe von 292 bp und *M. bovis* TMC410 bei einer Größe von 406 bp genau drei bzw. fünf komplette Kopien der sich hintereinander wiederholenden Sequenz (tandem repeat) enthalten.

nach FROTHINGHAM et al., 1998

5.5 Next generation sequencing (NGS)

Seit den letzten Jahren werden vermehrt neue Sequenzierungsmethoden entwickelt. Diese können einen deutlich höheren Datendurchsatz an Sequenzmengen verarbeiten als die bisher angewendete Technologie der klassischen Sanger-Methode, bei der nur 600 - 1000 bp durch Kettenabbruchverfahren und Gelseparation sequenziert werden können (LIN et al., 2008; SANGER et al., 1977). Diese neuen Hochleistungstechnologien werden unter dem Begriff NGS zusammengefasst und beinhalten verschiedene Verfahren wie etwa die Sequenzierung-durch-Synthese (sequencing by synthesis, SBS). Prinzipiell werden bei der SBS während der Sequenzierreaktion Signale durch jedes einzelne Nukleotid gesendet. Die Abfolge der Signale wird schließlich in die genomische Sequenz übersetzt. Von besonderem Nutzen ist das NGS zur Entschlüsselung von Gesamtgenomen (LIN et al., 2008). Die Analyse von Gesamtgenomen wird immer häufiger in der Diagnostik eingesetzt, da schnelle und detaillierte Informationen zur Evolutionsbiologie und Epidemiologie von Krankheitserregern erhalten werden können (ROETZER et al., 2013). Durch die Gesamtgenomsequenzierung können außerdem SNPs identifiziert werden (STUCKI et al., 2012), um die Erreger innerhalb des MTC und auch unterhalb der Speziesebene in eine phylogenetische Abstammung einzuordnen (COMAS et al., 2009; ROETZER et al., 2013; SCHÜRCH et al., 2012).

III PUBLIKATION

Region of Difference 4 in Alpine *Mycobacterium caprae* Isolates Indicates Three Variants

Janina Domogalla,^a Wolfgang M. Prodingler,^b Helmut Blum,^c Stefan Krebs,^c Susanne Gellert,^a Matthias Müller,^a Erdmute Neuendorf,^a Florian Sedlmaier,^a Mathias Büttner^a

Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany^a; Division of Hygiene and Medical Microbiology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria^b; Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany^c

The lack of complete genome sequence information for *Mycobacterium caprae* complicates a robust differentiation of *M. caprae* and *Mycobacterium bovis*. In this study, the presence or absence of *M. caprae*-specific single nucleotide polymorphisms in *lepA* and *gyrB* genes was assessed. The region of difference 4 (RD4) was analyzed for the identification and characterization of *M. caprae*. Molecular characteristics were evaluated in 12 recent *M. caprae* isolates from livestock and wildlife collected over a 3-year period in Bavaria, Germany. Conventional PCR strategies, sequence analysis of PCR fragments, and data from a next-generation sequencing approach together with variable-number tandem-repeat genotyping were utilized. Single nucleotide polymorphisms in the *lepA* and *gyrB* genes indicating the presence of *M. caprae* were detected in all the isolates. At least three different RD4 variants were found for Alpine *M. caprae* isolates. The results demonstrate that the RD4 region is rather heterogeneous in *M. caprae* genomes. As assumed by others, the presence of RD4 is critical for PCR-based differentiation of *M. caprae* from *M. bovis*, but in addition, the observed variability of RD4 allows the identification of *M. caprae* genotypes and may be indicative of a geographical-type appearance.

Mycobacterium caprae was first described in samples from goats in Spain (1) and was established in 2003 as a unique species in the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) (2) based on the presence or absence of regions of difference (RDs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) (3). *M. bovis* and *M. caprae* are the most relevant pathogens for livestock and wildlife large animal hosts. In some countries bovine tuberculosis (TB) is still a problem, particularly when a wildlife reservoir exists and TB transmission from wildlife to cattle and cattle to wildlife on the pasture is a permanent danger (4). Three wildlife reservoirs of TB caused by *M. bovis* have been described extensively (4–7). To date a wildlife reservoir harboring *M. caprae* has not been described. However, there have been several reports about *M. caprae* infections in red deer (*Cervus elaphus*) (8–12) and wild boars (*Sus scrofa*) (8, 9, 13) from continental European countries, mainly from Spain (8, 9) and from countries with Alpine wildlife habitats (10–13).

During the years 2007 and 2012 in the Bavarian Alpine “Allgäu” region, an area with plenty of cattle summer pastures also habituated by red deer, infections in cattle have been found to be mainly caused by *M. caprae*, whereas *M. bovis* was more frequent among animals found in the northern part of Germany, according to international unpublished findings of the national animal infectious disease reporting system, TierSeuchenNachrichten 3.0 (TSN 3.0).

The majority of molecular strategies for *M. caprae* differentiation refer to sporadically examined *M. caprae* isolates (3, 14, 15). In addition, a complete genome sequence of *M. caprae* is not available in the NCBI GenBank so far, in contrast to genome sequences of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. Comparative genomic studies with the complete DNA sequence of *M. tuberculosis* strain H37Rv have identified several *Mycobacterium tuberculosis*-specific genomic RDs which have been deleted in most other members of the MTC (14, 15). *M. caprae* isolates displayed the same RD deletions as *M. bovis* strains except for RD4, a 12.7-kb-spanning genomic region

that is absent in *M. bovis* but present in *M. caprae* (14). However, to our knowledge, only very few *M. caprae* isolates, including most isolates originating from Spain, have been tested with regard to the presence of the complete RD4 sequence; 4 *M. caprae* isolates originate from Spain (14, 16) and 10 isolates are without detailed origin information (15). Rodriguez et al. (8) confirmed the existence of 545-bp RD4-specific sequences in 62 of 63 *M. caprae* isolates. Notably, the detection of an RD4 deletion has been used as a major criterion for distinguishing *M. bovis* from the other members of the MTC, especially from *M. caprae* (16–21).

One *M. caprae*-specific T-to-G substitution at position 1311 in the *gyrB* sequence has been described in several *M. caprae* isolates from central Europe (12, 22, 23) and Spain (3, 8). However, Kubica et al. (24) reported that 3 of 55 German *M. caprae* isolates from human patients did not show this *M. caprae*-specific SNP. To date, the only commercially available DNA strip-based assay for the differentiation of MTC species, the GenoType MTBC line probe assay (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany), takes advantage of this SNP to differentiate *M. caprae* from other members of the MTC (25).

Reddigton et al. (26) described a novel *M. caprae*-specific C-to-T substitution at position 690 in the *M. tuberculosis* H37Rv *lepA* gene, which was conserved in all five tested *M. caprae* isolates originating from Germany and the Netherlands.

However, little is known about the genomic features of *M.*

Received 15 November 2012 Returned for modification 12 December 2012

Accepted 23 January 2013

Published ahead of print 13 February 2013

Address correspondence to Janina Domogalla, janina.domogalla@lgl.bayern.de.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02966-12

Domogalla et al.

TABLE 1 Origins of *Mycobacterium* DNA samples

Species	Isolate identification no.	Host, yr of origin ^a
<i>M. caprae</i>	09/RW044	Red deer isolate, 2009
<i>M. caprae</i>	10/RW314	Red deer isolate, 2010
<i>M. caprae</i>	10/RW079	Red deer isolate, 2010
<i>M. caprae</i>	11/D028	Red deer isolate, 2011 ^b
<i>M. caprae</i>	11/D133	Red deer isolate, 2011 ^b
<i>M. caprae</i>	11/D102	Red deer isolate, 2011 ^b
<i>M. caprae</i>	11/Roe010	Roe deer isolate, 2011 ^b
<i>M. caprae</i>	V-09-425	Cattle isolate, 2009
<i>M. caprae</i>	D6431	Cattle isolate, 2009
<i>M. caprae</i>	11/Rd152461	Cattle isolate, 2011
<i>M. caprae</i>	12/Rd52799	Cattle isolate, 2012
<i>M. caprae</i>	V-09-274	Sheep isolate, 2009
Other MTC members		
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177	NA
<i>M. africanum</i>	TT70/03	Nilgai isolate, 2004
<i>M. bovis</i>	V207	Cattle isolate, 2009
<i>M. bovis</i>	DSM 43990	NA
<i>M. bovis</i> BCG	ATCC 27289	NA
NTM members		
<i>M. arupense</i>	V-09-1049	Red deer isolate, 2009
<i>M. bohemicum</i>	V-09-1241	Red deer isolate, 2009
<i>M. vanbaalenii</i>	RW444	Red deer isolate, 2010
<i>M. nonchromogenicum</i>	RW712	Red deer isolate, 2010
<i>M. interjectum</i>	RW871	Red deer isolate, 2010
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	10016571500101	Cattle isolate, 2010
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	10016792400101	Cattle isolate, 2010

^a All the isolates originated in Bavaria, Germany. NA, not applicable.^b Isolates were obtained during the Tuberculosis in Alpine Wildlife project, carried out by 17 partners of the four Alpine countries (Austria, Germany, Switzerland, and Italy) and funded by their respective national research funding organizations and supported by the EMIDA ERA-Net (<http://tb-alpine-wildlife.org>).

caprae concerning markers for genotyping. Rapid and robust diagnostic differentiation of *M. caprae* is complicated by this fact.

We used different PCR protocols to determine whether genetic characteristics can be found to accurately differentiate *M. caprae* from the other MTC members. These PCR protocols were sequence analysis of PCR fragments and two standard PCR-based genotyping methods, spoligotyping (27) and mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) typing (28, 29). We assessed the presence or absence of *M. caprae*-specific SNPs in *lepA*, *gyrB* gene, and RD4 sequences in the genomes of 12 recent Alpine *M. caprae* isolates from livestock and wildlife. In addition, we compared the results of a next-generation sequencing approach used to analyze DNA from seven *M. caprae* isolates. PCR and whole-genome sequencing revealed that three different RD4 variations exist for *M. caprae* isolates originating from delimited Alpine regions of Bavaria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and DNA preparation. A total of 12 *M. caprae* isolates from domestic and wildlife hosts in different parts of Bavaria, Germany, were analyzed (Table 1). For standardization of PCR setups, five isolates of MTC and seven isolates from nontuberculosis mycobacteria (NTM) species were used (Table 1). Clinical isolates were characterized using

GenoType MTBC, GenoType mycobacterium AS, and GenoType mycobacterium CS (all from Hain Lifescience GmbH). The DNA of the NTM strains was obtained from the strain collection of the Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleissheim, Germany.

MTC isolates were grown in liquid medium (Middlebrook 7H9 broth; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) supplemented with 800 µl polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim, and azlocillin (BBL MGIT PANTA) (Becton Dickinson) and were incubated at 37°C for 4 weeks. After two washing steps and heat inactivation (30 min at 95°C), genomic DNA from MTC isolates for PCR and whole-genome sequencing was extracted from 1.5 ml liquid culture using the cetyltrimethylammonium bromide method and purification with phenol-chloroform. DNA concentrations were determined with a Nanodrop ND-1000 device (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany).

Molecular typing. Two PCR-based genotyping methods were applied for the molecular characterization of *M. caprae* isolates, spoligotyping (27) and MIRU-VNTR typing (28, 29). The latter determines the copy numbers in 24 or 25 VNTR loci and is regarded as the actual gold standard for comparison of MTC strains (29). DNA for PCR amplification was obtained by the boiled-prep method (11). Spoligotyping was performed as described by Kamerbeek et al. (27). MIRU-VNTR typing was carried out using single PCRs for each locus and DNA fragments were analyzed by gel electrophoresis, as described earlier (11). Fingerprint patterns were digitally compared using BioNumerics software version 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Whole-genome sequencing. Seven isolates of *M. caprae* were sequenced on a MiSeq-Illumina instrument with paired-end sequencing and a read length of 150 bp in each direction. For the isolates 09/RW044, 10/RW079, 11/D028, and 11/D102, sequencing libraries were prepared from 100 ng of fragmented DNA sonicated with a Bioruptor (NextGen, Diagenode, Liege, Belgium) (for 25 cycles with 30 s on/30 s off) and the Rapid Library preparation kit (NuGen Inc., San Carlos, CA) and were amplified by 6 cycles of PCR with Illumina P5 and P7 primers (P5, AAT GATACGGCGACACCGA; P7, CAAGCAGAAGACGGCATACGA). After the PCR step, libraries were purified with AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, CA) and quantified with a Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA). From the isolates 11/Rd152461, 12/Rd52799, and 11/Roe010, respectively, 1 ng of AMPure XP-purified DNA was used to prepare fragmented libraries with the XT kit (Illumina, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions.

The raw sequencing data were imported to a locally installed instance of the Galaxy platform (30). Raw reads were demultiplexed, adapter and quality trimmed, and mapped to the *M. tuberculosis* reference genome H37Rv (GenBank database, accession number CP003248) with the program BWA (31). Regions of interest were inspected on the Integrative genomics viewer (IGV), a lightweight visualization tool that enables intuitive real-time exploration of diverse, large-scale genomic data sets on standard desktop computers (32) in order to find large deletions.

Primer and probe design. The primers and the probe are listed in Table 2. Nucleotide sequence data for the primers and the probe were deduced from various reports (14, 16, 18, 26, 33) or were generated in this study using the NCBI/Primer-BLAST program (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) based on the sequences derived from whole-genome sequencing analysis.

All primers and probes were purchased from Primer-Management (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

Real-time PCR. The reactions were run in a Stratagene Mx3005P real-time thermocycler (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Thermocycling, fluorescent data collection, and data analysis were performed with MxProTM quantitative PCR (qPCR) software (Agilent Technologies).

***lepA*-based species-specific real-time PCR for *M. caprae*.** Each reaction consisted of 1 U *Taq* DNA polymerase recombinant (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Germany), 1× PCR buffer, 5 mM MgCl₂, 1 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 450 nM forward (MTC_Fw)

TABLE 2 Probe and primers for *lepA* specific real-time PCR and primers for PCR detection of the *gyrB* gene and RD4 region

Primer	PCR type	Nucleotide sequence (5' to 3')	Reference no.
MTC_Fw	<i>lepA</i> -based species specific	AGA CCG TGC GGA TCT TG	26
MTC_Rv	<i>lepA</i> -based species specific	CAT GGA GAT CAC CCG TGA	26
<i>M. caprae</i> -specific probe	<i>lepA</i> -based species specific	FAM TAT CGG GTA CAC AAA GAC GA-BHQ1	26
MTUBf	<i>gyrB</i> -based species specific	TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC	33
MTUBr	<i>gyrB</i> -based species specific	ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG	33
RD4F	RD4 internal left part	CCA CGA CTA TGA CTA GGA CAG CAA	18
RD4R	RD4 internal left part	AAG AAC TAT CAA TCG GGC AAG ATC	18
Rv1510F	RD4 internal central part	GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC	16
Rv1510R	RD4 internal central part	TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C	16
RD4-flankF	RD4 5-kb deletion flanking PCR	CTC GTC GAA GGC CAC TAA AG	14
RD4-5kbDelR	RD4 5-kb deletion flanking PCR	TTC GTT AGC CGC ACA TCC ATG A	
RD4-DelF	RD4 38-kb deletion flanking PCR	GAA GGA AGC GGC TGC GAT TGG TGC	
RD4-DelR	RD4 38-kb deletion flanking PCR	TGG TTA CAC GCT CGG CGC AGT CA	

and reverse (MTC_Rv) primers, 125 nM *M. caprae*-specific probe, 0.5 μ l of internal control (IC)-primer-probe mix (2.5 pmol primer/ μ l plus 1.25 pmol probe/ μ l), 1 μ l ruminant IC DNA sample (200 ng/ μ l), 5 μ l of template (0.1 to 0.3 ng/ μ l), and RNase-free water to a final volume of 25 μ l. The IC for the detection of the beta-actin mRNA was added to each setup in order to assess *Taq* polymerase inhibition (34). The cycling parameters were: 5 min incubation at 95°C and 45 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 30 s.

Conventional PCR. PCR amplifications were performed in a T3000 thermocycler (Biometra, Goettingen, Germany). The PCR-amplified DNA fragments were separated by electrophoresis in 0.8 to 2% agarose gels and visualized under UV after ethidium bromide staining.

***lepA*-based species-specific conventional PCR for the MTC.** The PCR mixture was prepared with 0.05 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 1 \times reaction buffer, 1.25 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 μ M each primer (MTC_Fw/MTC_Rv), 1 μ l template, and RNase-free water to 50 μ l per reaction to amplify a 155-bp *lepA* fragment. The cycling parameters were denaturation for 15 min at 95°C, 35 cycles of 95°C for 1 min, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s and a final elongation step of 10 min at 72°C (program 1).

***gyrB*-based species-specific PCR for the MTC.** Primers MTUBf/MTUBr were used to amplify a 1,020-bp *gyrB* fragment that comprises the discriminative regions from six *M. caprae* isolates. The PCR mixture contained 0.05 U of Phusion high-fidelity DNA polymerase (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany), 1 \times reaction buffer, 0.2 mM dNTP, 0.5 μ M each primer, 1 μ l template, and RNase-free water to 50 μ l. The cycling parameters were denaturation for 30 s at 98°C, 35 cycles of 10 s at 98°C and 30 s at 72°C, and a final elongation step of 10 min at 72°C.

RD4-based species-specific PCR for MTC detection. Primers chosen to amplify an internal fragment of RD4 (Fig. 1) were used in two PCRs with DNA from all *M. caprae* isolates. The two fragments that were amplified applied to the left and central parts of RD4 of the *M. tuberculosis* H37Rv genome in the 5'-to-3' direction.

For the RD4 internal left part, an 88-bp fragment of the left part of RD4 (Fig. 1) was amplified in a 50- μ l reaction mixture containing 0.05 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen), 1 \times reaction buffer, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 μ M each primer (RD4F/RD4R), 1 μ l template, and RNase-free water (PCR mixture 1). The cycling parameters were those for program 1 but with an annealing of 55°C for 30 s.

For the RD4 internal central part, a 1,031-bp fragment of the central part of RD4 (Fig. 1) was amplified using PCR mixture 1 but with 1 \times Q solution and primer Rv1510F/Rv1510R. The cycling parameters were those for program 1 but with an annealing of 60°C for 1 min and an extension step of 72°C for 1 min.

RD4 5-kb deletion-flanking PCR. Previous results from contig sequences in the next-generation sequencing approach suggested a 5-kb deletion present in the left part of the RD4 sequence in some *M. caprae*

genomes. Hence, flanking primers specific to the deletion were chosen for a PCR setup with DNA from the *M. caprae* isolates (Fig. 1). To amplify a calculated DNA fragment of approximately 700 bp, we used PCR mixture 1 but with 1 \times Q solution and primer (RD4-flankF/RD4-5kbDelR). Instead of dGTP, 7-deaza-2'-deoxy-GTP (Roche, Mannheim, Germany) for GC-rich templates was used. The cycling parameters were program 1 but with an annealing step of 55°C for 1 min and an extension step of 72°C for 1 min.

In addition, PCR mixture 1 but with 1 \times Q solution and primer (RD4-flankF/Rv1510R) was used for amplification of a 2.5-kb deletion-flanking fragment from the *M. caprae* isolates 11/D028 and 10/RW079. The cycling parameters were program 1 but with an annealing step of 55°C for 1 min and an extension step of 72°C for 2 min.

For amplification of the 6.9-kb DNA fragment that comprised the left and central parts of the RD4 sequence in *M. caprae* isolates without deletion, the PCR master mix contained 0.05 U of Phusion high-fidelity DNA polymerase (Biozym Scientific, GmbH), 1 \times GC buffer, 0.2 mM dNTP, 0.5 μ M each primer (RD4-flankF/Rv1510R), 1.5 μ l dimethyl sulfoxide (DMSO), 1 μ l template, and RNase-free water to 50 μ l. The cycling parameters were denaturation for 1 min at 98°C followed by 35 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 65°C, and 260 s at 72°C and a final elongation step of 10 min at 72°C.

RD4 38-kb deletion-flanking PCR. The results of next-generation sequencing suggested that a 38-kb deletion spanning the whole RD4 region might be present in some *M. caprae* genomes (Fig. 1). Hence, flanking primers adjacent to the suspected deletion were designed for amplification of a small approximately 250-bp fragment representing flanking sequences. PCR mixture 1 was used but with 1 \times Q solution and primer (PDelF/PDeLR). The cycling parameters were program 1 but with an annealing step of 55°C for 1 min and an extension step of 72°C for 1 min.

Sequencing and sequence analysis. DNA fragments were prepared for sequencing by the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and sequencing was performed by Eurofins MWG Operon. The obtained sequences were compared with each other and with genomic sequences of members of the MTC, available from the genome database of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>). The sequence data were aligned by using the Clustal W2 program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (35).

Nucleotide sequence accession numbers. Sequence reads obtained from genomic sequencing of the *M. caprae* isolates RW/044, RW/079, 11/D028, and 11/D102 have been deposited in SRA (<http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>). Bam files of these isolates mapped to H37Rv are available under the accession numbers SRS386245, SRS386249, SRS386254, and SRS386255. The obtained PCR sequences of the 5-kb and 38-kb deletion-flanking regions and the fragment of the *gyrB* gene amplification were deposited at NCBI GenBank under the accession numbers listed in Table 3.

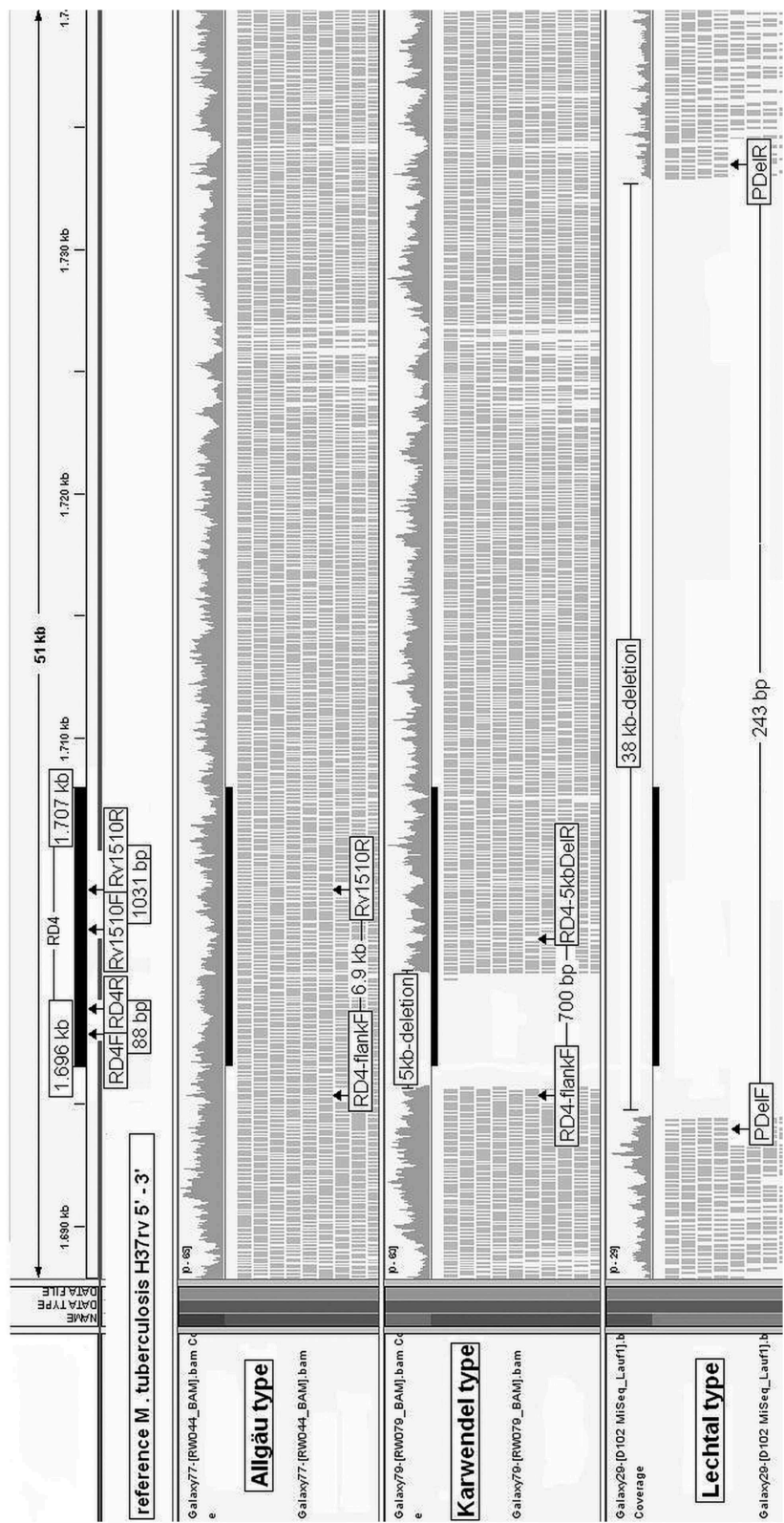


FIG 1 Screenshot of the mapping of the *M. caprae* whole-genome sequencing data to the *M. tuberculosis* reference genome. RD4 nucleotide sequence variations for *M. caprae* isolates from red deer living in the Alpine region of Bavaria, Germany, are shown. The graph was constructed by the Integrative Genomics Viewer (IGV) using Illumina MiSeq paired-end reads of isolate numbers 09/RW044, 10/RW079, and 11/D102. RD4 is represented as a bold black line. The gray histograms indicate the sequence coverage, and the small gray bars indicate individual reads mapped to the corresponding genomic positions. Absence of coverage indicates the respective deletions (marked by solid lines in the histograms) in the RD4 region that were confirmed by PCR with primers (positions shown by boxes and arrows) flanking the deletions and yielding product sizes (shown between the arrows) consistent with the positions and sizes of the respective deletions.

TABLE 3 RD4 mapping and genotypes of 12 representative *M. caprae* isolates from southern Bavaria and accession numbers of amplified *gyrB* and RD4 deletion-adjacent sequences

Isolate no.	PCR result		Accession no.		Genotyping		
	RD4 internal left portion	RD4 internal central portion	Amplified <i>gyrB</i> sequence ^a	RD4 deletion-adjacent sequence	MIRU-VNTR code ^b	Spoligotype ^c	Type
11/D028	—	+		^d	2364212535222534133363322	SB2174	Karwendel
10/RW079	—	+	JX420304	KC007398 ^{d,e}	2364212535222534133363322	SB2174	Karwendel
V-09-425	—	+		^d	2364212535222534133363322	SB2174	Karwendel
11/D133	—	+		^d	2364212535222534133363322	SB2174	Karwendel
V-09-274	—	—		JX420311	2264242433224534132553323	SB0418	Lechtal
11/D102	—	—	JX308291	JX420308	2264242433224534132553323	SB0418	Lechtal
11/Roe010	—	—	JX420306	JX420309	2264242433224534132553323	SB0418	Lechtal
12/Rd52799	—	—	JX420307	JX420310	2264242433224534132553323	SB0418	Lechtal
09/RW044	+	+	JX420305		2354242534224534122243322	SB0418	Allgäu
10/RW314	+	+	JX420303		2354242534224534122243322	SB0418	Allgäu
11/Rd152461	+	+			2354242534224534122243322	SB0418	Allgäu
D6431	+	+			2354242534224534122243322	SB0418	Allgäu

^a In addition to the GenoType MTBC assay, sequences provide information about the SNPs in the *gyrB* gene.

^b Copy numbers in loci MIRU2-4-10-16-20-23-24-26-27-31-39-40 and VNTR424-577-1982-2401-3690-4156-1955-2163b-2165-2347-2461-3171-4052. Copy numbers differing from the Lechtal genotype are in bold type.

^c According to www.mbovis.org.

^d A 700-bp fragment was obtained, but the nucleotide sequence could not be determined because of high guanine-cytosine content.

^e Results from contig sequences in the next-generation sequencing of the 2.5-kb PCR approach produced a 2,224-bp fragment spanning the 5-kb deletion.

RESULTS

SNP analysis. The *M. caprae*-specific *gyrB* gene SNPs were detected using GenoType MTBC (Hain Lifescience GmbH) in all 12 *M. caprae* isolates. Additionally, these SNPs of the *gyrB* gene (22) were confirmed by the determined nucleotide sequences of six *M. caprae* isolates (Table 3).

Using real-time PCR with an *M. caprae*-specific probe (26), we identified the *M. caprae* characteristic C-to-T substitution at position 690 of the *lepA* gene in all 12 isolates. Sequences indicative of other members of the MTC and NTM, respectively, were not detected. A 155-bp PCR fragment of the *lepA* gene was obtained from all MTBC members in a conventional PCR setup, but not from NTM members. Hence the data confirm that the *M. caprae*-specific probe binding within the *lepA* gene allows the identification of *M. caprae* isolates.

RD4 and genotyping analysis. A MIRU-VNTR and spoligotyping code was obtained for *M. caprae* samples (Table 3), and two RD4-based PCR setups were chosen to amplify an internal fragment of the left and central parts in the RD4 sequence. The results of the cluster analysis by MIRU-VNTR genotyping and the RD4-based PCR setups allowed a discrimination of three groups of *M. caprae* isolates (Table 3). The geographic origin of the *M. caprae* isolates supported the diversity of genotyping and RD4 pattern results (Fig. 2). According to the RD4 differences and the MIRU-VNTR code, we chose the origin-related designations Allgäu, Lechtal, and Karwendel types for the three groups of our Alpine *M. caprae* isolates (Table 3).

The complete sequence of RD4 proved to be conserved in the Alpine *M. caprae* isolates of the Allgäu type (Fig. 1). The results of analysis of the next-generation sequencing data sets of eight *M. caprae* isolates performed using the program IGV suggested the presence of two different deletions of 5 kb in the genome of the Karwendel type and of 38 kb in the genome of the Lechtal type (Fig. 1). To confirm this finding, we designed flanking primers specific for deletion-adjacent sequences.

The sequence analysis of amplified deletion-flanking frag-

ments showed that the 38-kb deletion includes the nucleotide sequences from position 1.694595 to 1.732924 in the *M. tuberculosis* H37Rv genome encompassing the whole RD4.

Using flanking primers specific for the 5-kb deletion, we obtained an approximately 700-bp PCR fragment for all *M. caprae* isolates of the Karwendel type. The nucleotide sequence of the PCR fragment could not be determined because of a high guanine-cytosine content. However, results from contig sequences in the Illumina sequencing of the 2.5-kb PCR approach of isolate 10/RW079 resulted in a 2,224-bp fragment spanning the 5-kb deletion. In this fragment, the 5-kb deletion contains the sequence stretch from position 1.695834 to 1.700422 spanning the left part of RD4. Of particular interest is the finding that the deletion is located 188 bp upstream of the previously assumed RD4 deletion in the genome of *M. bovis* subsp. *bovis* strain AF2122/97 (14, 21, 36). Notably, these genomic characteristics of the Allgäu, Lechtal, and Karwendel types isolated from red deer were also present in isolates from cattle from the respective geographic regions (Table 2; Fig. 2).

DISCUSSION

Twelve *M. caprae* isolates originating from wildlife and livestock in the Bavarian Alpine region of Germany were evaluated for genomic traits. The presence or absence of *M. caprae*-specific SNPs in the *lepA* and *gyrB* genes and of RD4-specific sequence peculiarities were assessed for identification and characterization of the *M. caprae* isolates.

The *M. caprae*-specific T-to-G substitution at position 1331 of the *gyrB* sequence and the C-to-T substitution at position 690 of the *lepA* sequence were confirmed to be conserved in all tested *M. caprae* isolates. The presence of these single-nucleotide changes was shown to be a stable marker in our Alpine *M. caprae* isolates as well as for *M. caprae* infections of different host species. However, it remains to be tested whether the sensitivity of the PCR is sufficient when DNA is prepared directly from native tissue samples.

Interestingly, three different RD4 variations were found in Ba-

Domogalla et al.

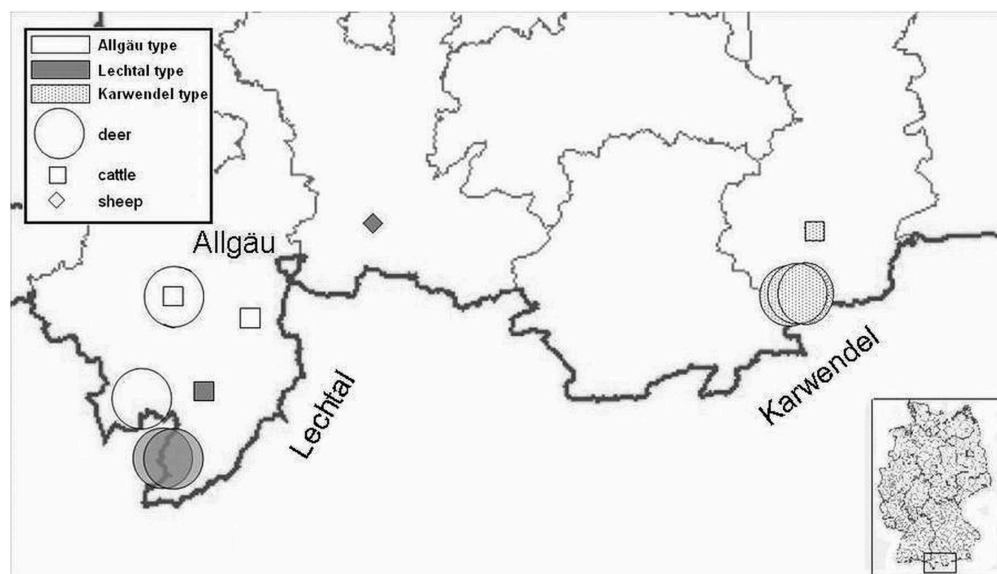


FIG 2 Geographic distribution of the three types of Bavarian *M. caprae* isolates included in this study. Each symbol indicates the host species. The *M. caprae* types are represented by shading, and the number of symbols reflects the number of tuberculosis cases. (Primary artwork reproduced with permission of TSN 3.0.)

varian Alpine *M. caprae* isolates which corresponded with their geographic origins and genotypes (Fig. 1 and Fig. 2). The absence of RD4 has previously been described as a marker for *M. bovis* (14–21). However, only a few *M. caprae* isolates have been tested so far with refined sequence analysis of RD4, and most isolates originated from Spain (14–16). Rodríguez et al. (8) verified the existence of RD4-specific sequences in 62 Spanish *M. caprae* isolates without giving detailed information about the primers used. Hence it is unknown which part of RD4 was detected and it has not been confirmed that the whole RD4 sequence is conserved. The results of our study demonstrate that RD4 is not uniformly present in Alpine *M. caprae* genomes as assumed to date. Due to this heterogeneity, RD4 cannot be recommended for use in effective differentiation of *M. caprae* from *M. bovis*. It cannot be excluded that further genomic deletions may be found in other *M. caprae* isolates.

The 5-kb deletion in the Karwendel type includes the genes Rv1505c to Rv1509, whereas the 38-kb deletion in the Lechtal type has led to the loss of the genes Rv1504c to Rv1531. This finding is of particular interest because RD4 is predicted to encode proteins involved in membrane degradation (Rv1508c) and exopolysaccharide synthesis (Rv1516c) (37). In addition, Al-Khodari et al. (38) identified in TB-infected persons immunodominant peptides reactive with antibodies recognizing amino acid (aa) epitopes 241 to 265 of Rv1508c and aa 325 to 336 of Rv1516c. Thus, some peptide sequences eliciting an antibody-mediated immune response are not well conserved in Alpine *M. caprae* isolates, and their loss may be a result of long-term host interactions.

During the past 10 years, a low but consistent incidence of *M. caprae* was registered in the Alpine part of Bavaria, Germany, according to TSN 3.0 reports. Efficient TB control should include epidemiological surveillance systems based on mycobacterial species identification to gain a better knowledge about the regional occurrence and host range of MTC members and other mycobacterial species. DNA fingerprinting methods have proven to be

powerful epidemiologic tools for the differentiation of the MTC, the current gold standard being MIRU-VNTR typing (29). The presence of three types of the Bavarian Alpine *M. caprae* isolates, all three found in both cattle and red deer, clearly demonstrates tuberculosis transmission between livestock and wildlife (Fig. 2). However, the primary host of the strains cannot be predicted. Notably, the three types have shown a remarkable genetic stability for at least 3 years (Table 1).

To date, the Allgäu type has not been described. The region-specific types, genotype Lechtal and genotype Karwendel, have been found in bordering regions in Austria and were characterized by spoligotyping and MIRU-VNTR for 12 loci (10–12). The genotype Lechtal has been identified in a “hot spot” area of TB in red deer (prevalence 23.1%) in the Lechtal, Austria (12). Because of the local high incidence in the red deer population, a high red deer transmission rate of the Lechtal type can be assumed. A spillover of the Lechtal type to the German Allgäu region seems likely. On the other hand, the Allgäu type exists in the same area of Bavaria and contains the complete RD4. This raises the question of whether the RD4 deletion in the Lechtal type might have evolved from the Allgäu type by animal passages. It became evident that a detection of the three variants of RD4 sequences was not possible using spoligotyping or MIRU-VNTR based on repetitive DNA elements. However, informative SNPs are valuable markers for classifying MTC members into phylogenetic lineages because of very low degrees of homoplasy (39, 40). Whole-genome sequencing provides complete information for the identification of a sufficient number of reliable SNPs and the genomic characteristics of *M. caprae* (41).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the EMIDA ERA-Net coordination board for helpful discussions and the consortium for agreement with publication of the manuscript. We are grateful to Eva Maria Gerstmair, Ludmilla Naumann, and

the Tuberculosis Culture Collection Laboratory of the Bavarian Health and Food Safety Authority for providing isolates.

This work was funded by the EMIDA ERA-Net Project Tuberculosis in Alpine Wildlife (BMBF-FK0315857A) and the Bavarian State Ministry of Environment and Health.

REFERENCES

- Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, Blázquez J, Baquero F, Mateos A, Suárez G, Domínguez L. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1263–1273.
- Wayne LG, Kubica GP. 1986. The mycobacteria, p 1435–1457. In Sneath PHA, Holt JG (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1785–1789.
- Jenkins HE, Woodroffe R, Donnelly CA. 2008. The effects of annual widespread badger culls on cattle tuberculosis following the cessation of culling. *Int. J. Infect. Dis.* 12:457–465.
- O'Brien DJ, Schmitt SM, Rudolph BA, Nugent G. 2011. Recent advances in the management of bovine tuberculosis in free-ranging wildlife. *Vet. Microbiol.* 151:23–33.
- Ryan TJ, Livingstone PG, Ramsey DS, de Lisle GW, Nugent G, Collins DM, Buddle BM. 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Vet. Microbiol.* 112:211–219.
- Conner MM, Ebinger MR, Blanchong JA, Cross PC. 2008. Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1134:146–172.
- Rodríguez S, Bezos J, Romero B, de Juan L, Álvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Javed MT, Sáez-Llorente JL, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A; Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis. 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 17:532–535.
- Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Fernández-De-Mera IG, Juste R, Barral M, Gortazar C. 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet. Res.* 37:107–119.
- Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schönbauer M, Glawischig W. 2002. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J. Clin. Microbiol.* 40:2270–2272.
- Prodinger WM, Brandstätter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschirolu ML, Aranaz A, Nagy G, Cvetnic Z, Ocepek M, Skrypnik A, Erler W, Niemann S, Pavlik I, Moser I. 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 43:4984–4992.
- Schoepf K, Prodinger WM, Glawischig W, Hofer E, Revilla-Fernandez S, Hofrichter J, Fritz J, Köfer J, Schmoll F. 2012. A two-years' survey on the prevalence of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in red deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN Vet. Sci.* doi:10.5402/2012/245138.
- Erler W, Martin G, Sachse K, Naumann L, Kahlau D, Beer J, Bartos M, Nagy G, Cvetnic Z, Zolnir-Dovc M, Pavlik I. 2004. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. *J. Clin. Microbiol.* 42:2234–2238.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:3684–3689.
- Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Infect. Dis.* 186:74–80.
- Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.* 41:1637–1650.
- Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32:643–655.
- Halse TA, Escuyer VE, Musser KA. 2011. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 49:2562–2567.
- Pinsky BA, Banaei N. 2008. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 46:2241–2246.
- Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y. 2007. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology* 153:1243–1249.
- Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesselning A, Engelke E, de Kock M, Gutierrez MC, Chege GK, Victor TC, Hoal EG, van Helden PD. 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10:818–822.
- Niemann S, Harmsen D, Rüsche-Gerdes S, Richter E. 2000. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 38:3231–3234.
- Boniotti MB, Gorla M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A, Tisato E, Zannoni M, Zoppi S, Donato A, Tagliabue S, Bonora S, Zanardi G, Pacciarini ML. 2009. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 47:636–644.
- Kubica T, Rüsche-Gerdes S, Niemann S. 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 41:3070–3077.
- Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Rüsche-Gerdes S. 2004. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 42:4303–4306.
- Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, van Soolingen D, Barry T. 2011. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. *PLoS One* 6:e23481. doi:10.1371/journal.pone.0023481.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907–914.
- Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:1901–1906.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44:4498–4510.
- Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, The Galaxy Team. 2010. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol.* 11:R86. doi:10.1186/gb-2010-11-8-r86.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* 29:24–26.
- Kasai H, Ezaki T, Harayama S. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38:301–308.
- Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. 2007. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods* 140:115–123.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M,

Domogalla et al.

- Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:7877–7882.
37. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* 46:709–717.
38. Al-Khodari NY, Al-Attayah R, Mustafa AS. 2011. Identification, diagnostic potential, and natural expression of immunodominant seroreactive peptides encoded by five *Mycobacterium tuberculosis*-specific genomic regions. *Clin. Vaccine Immunol.* 18:477–482.
39. Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. 2009. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One* 4:e7815. doi:10.1371/journal.pone.0007815.
40. Schürch AC, van Soolingen D. 2012. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 12:602–609.
41. Stucki D, Malla B, Hostettler S, Huna T, Feldmann J, Yeboah-Manu D, Borrell S, Fenner L, Comas I, Coscollà M, Gagneux S. 2012. Two new rapid SNP-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. *PLoS One* 7:e41253. doi:10.1371/journal.pone.0041253.

IV DISKUSSION

1 Bedeutung der Differenzierung von Rindertuberkuloseerregern

Weltweit sind die meisten zoonotischen Tuberkulose-Fälle auf *M. bovis* zurückzuführen. Als Reservoir wurden dabei hauptsächlich Rinder identifiziert (AYELE et al., 2004; COSIVI et al., 1998). Somit stellt eine fehlende oder unzureichende Kontrolle der Rindertuberkulose ein erhöhtes Infektionsrisiko für den Menschen dar (MÜLLER et al., 2013). Zudem hat die Rindertuberkulose als chronisch persistierende Infektion Einfluss auf die landwirtschaftliche Produktion und den internationalen Handel mit Tieren und deren Produkten (MILIAN SUAZO et al., 2003). Daher ist die Bekämpfung dieser Tierseuche zur Sicherung der Gesundheit von Mensch und Tier unbedingt notwendig.

Für eine effektive Bekämpfung sind vor allem der epidemiologische Hintergrund und Infektketten von großer Bedeutung. Um detailliertere Informationen über mögliche Infektketten und genetische Veränderungen durch Tierpassage und Wirtswechsel zu erhalten, ist es nötig, eine Differenzierung unterhalb der Speziesebene durchzuführen. Denn eine akkurate Identifizierung und Charakterisierung des Erregers liefert Erkenntnisse zur Prävalenz, Transmission und globalen Verteilung (KIERS et al., 2008). Jedoch sind die Genome der Mitglieder des MTC zu 99,9 % identisch (GORDON et al., 1999). Demnach gestaltet sich die Entwicklung eines schnellen, sicheren und einfachen Tests für die Speziesdifferenzierung und insbesondere der Subtypisierung als besonders schwierig. Bisherige Möglichkeiten zur Subtypisierung bieten die oft verwendeten Methoden des MIRU-VNTR und Spoligotyping (PRODINGER et al., 2005). Allerdings sind diese Methoden zeitaufwendig und können nicht von jedem Labor routinemäßig durchgeführt werden. Zudem wird für die Differenzierung mykobakterielle DNA aus der Kultur benötigt. Demzufolge sind diese Techniken nicht aus dem Untersuchungsmaterial durchführbar und setzen eine erfolgreiche Anzucht voraus.

Diese Studie befasst sich erstmalig mit der Subtypisierung von *M.-caprae*-Isolaten anhand der genetischen Variabilität der RD4-Sequenz. In dieser Arbeit wurde erstmalig nachgewiesen, dass die RD4-Sequenz nicht genetisch einheitlich im Genom von *M. caprae* konserviert ist. Drei unterschiedliche Varianten der RD4-Region wurden in den untersuchten Isolaten detektiert. Zum einen ist die gesamte RD4-Sequenz erhalten und zum anderen ist sie partiell von einer 5-kb-Deletion betroffen. In der dritten Variation ist die gesamte Sequenz der RD4-Region durch eine 38-kb-Deletion verloren gegangen. Die Möglichkeiten und Grenzen der Subtypisierung von *M.-caprae*-Isolaten anhand ihrer Variation in der RD4-Sequenz sollen

im Folgenden diskutiert werden. Zudem wird die Bedeutung der erstmalig nachgewiesenen Deletionen im Bereich der RD4-Region von *M. caprae* für die sichere Speziesdifferenzierung von *M. bovis* erörtert.

2 Differenzierung von *M. bovis* anhand der RD4

Die Deletion der kompletten 12,7 kb umfassenden RD4-Sequenz wird häufig als Differenzierungskriterium für *M. bovis* verwendet (HALSE et al., 2011; HUARD et al., 2003; PINSKY et al., 2008). Allerdings kann die Verwendung von Primern, die innerhalb der RD4-Sequenz ansetzen (interne Primer) (HALSE et al., 2011; HUARD et al., 2003), bei den in dieser Arbeit nachgewiesenen RD4-Typen Lechtal und Karwendel zu einer Fehlinterpretation der Spezies führen. Beispielsweise publizierten Halse et al. eine Differenzierungs-PCR für die Mitglieder des MTC. Die An- oder Abwesenheit von RD1, RD4, RD9, RD12, ext-RD9 ermöglicht dabei eine Speziesidentifizierung. Die einzige Unterscheidungsmöglichkeit zwischen *M. caprae* und *M. bovis* beruht auf der Detektion der RD4-Sequenz (HALSE et al., 2011). Jedoch ist die Zielsequenz der internen Primer nach den jetzt erhaltenen Ergebnissen in den 5 kb und 38 kb umfassenden Deletionen der Typen Lechtal und Karwendel enthalten (Abbildung 7). Demnach würden diese *M. caprae* Subtypen identische Reaktionen wie *M. bovis* in den PCR-Ansätzen aufweisen (Tabelle 5). Somit würde die Verwendung dieser Differenzierungs-PCR zu einer falschen Speziesdifferenzierung führen.

Tabelle 5: Fehlinterpretation der *M. caprae*/*M. bovis* Speziesdifferenzierung durch die Verwendung von innerhalb der RD4-Sequenz liegenden Primern

Spezies	RD4 Typ	RD1*	RD4~	RD9*	RD12*	ext-RD9*
<i>M. caprae</i>	RD4-Allgäu Typ	+	+	-	-	+
	RD4-Karwendel Typ	+	-	-	-	+
	RD4-Lechtal Typ	+	-	-	-	+
<i>M. bovis</i>		+	-	-	-	+

~ : Durchführung mittels konventioneller PCR (RD4 internal left part Table 3, Publikation)

* : Es wurde keine PCR diese Regionen betreffend durchgeführt, die Ergebnisse beruhen auf Literaturangaben (ARANAZ et al., 2003; BROSCHE et al., 2002; HALSE et al., 2011). Zusätzlich wurden die Deletionen in RD9 und RD12 im Integrative Genomics Viewer (IGV) für die RD4 Typen analysiert (Abbildung A1).

ext-RD9: (exterior-RD9, extern der RD9 liegende Region, die in allen MTC Spezies konserviert ist)

Dagegen stellt die Verwendung von RD4-flankierenden Primern, wie von Taylor et al., (2007a und 2007b) beschrieben, eine genauere Möglichkeit zur Differenzierung von *M. bovis* dar. Dabei wird ein PCR-Fragment nur erhalten, wenn die entsprechende 12,7 kb umfassende RD4-Deletion von *M. bovis* vorliegt. Ansonsten verhindert die Präsenz der 12,7 kb umfassenden RD4-Sequenz eine Amplifikation (TAYLOR et al., 2007a; TAYLOR et al., 2007b). Jedoch lassen die Deletionen der *M. caprae* RD4-Typen Karwendel und Lechtal ebenfalls keine Amplifikation zu. Demnach kann durch ein negatives PCR Ergebnis nicht auf das Vorhandensein der RD4-Sequenz geschlossen werden.

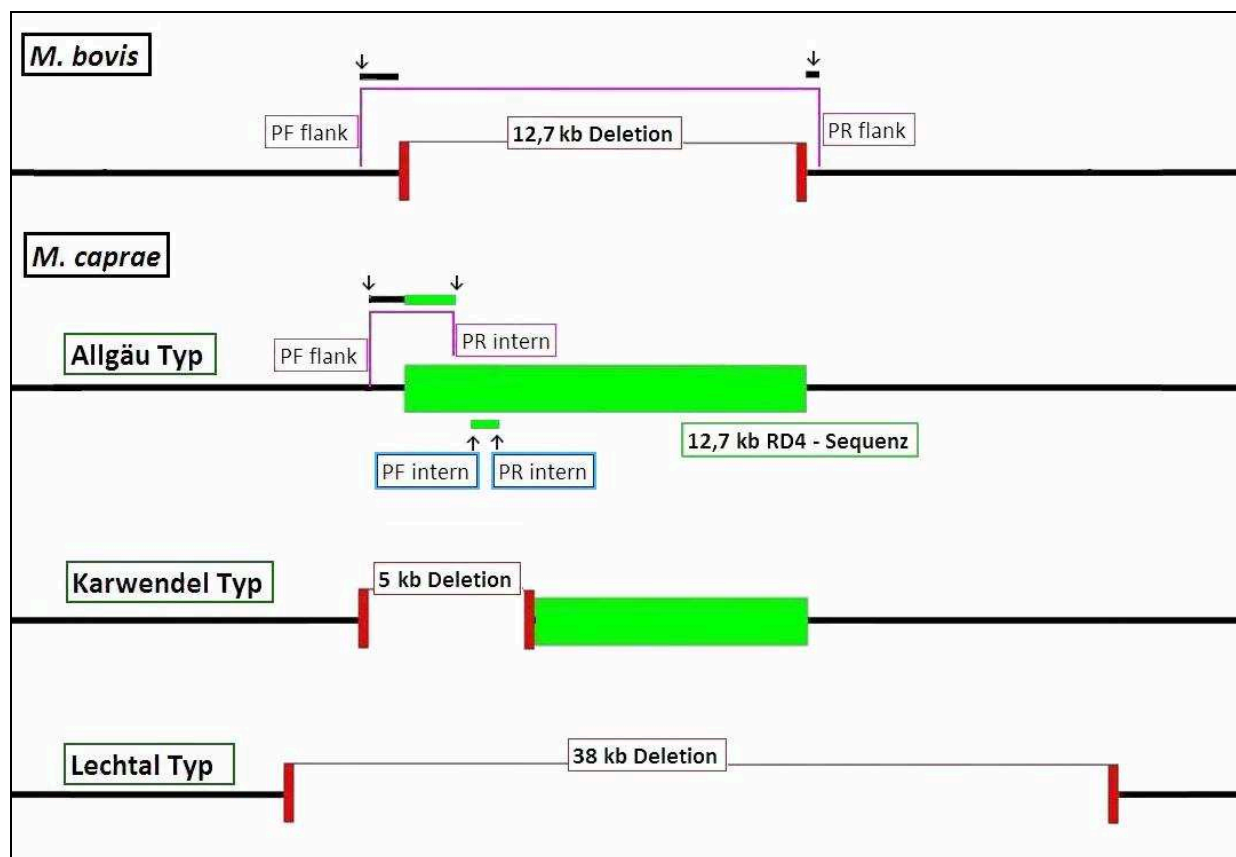


Abbildung 7: schematische Darstellung des Genoms von *M. caprae* und *M. bovis* im Bereich der RD4-Region

Sequenz außerhalb der RD4: RD4-Sequenz: Deletion:

↑ Primerbindung mit Amplifikaten

Lage der internen Primer nach HALSE et al., 2011:

Darstellung der Lage der Primer einer PCR mit Nutzung von drei Primern:

PF = forward Primer; PR = reverse Primer

Eine weitere Variante zur Überprüfung der Präsenz oder Absenz der RD4-Sequenz stellen in der Literatur beschriebene PCR-Ansätze mit drei Primern dar. In diesen wird neben dem RD4-flankierenden Primer-Paar zusätzlich ein weiterer Primer eingesetzt. Dieser detektiert eine Sequenz im vorderen Teil der RD4-Region (PINSKY et al., 2008; SOMOSKOVI et al., 2008; WARREN et al., 2006). Der Vorteil besteht darin, dass je nach Primer-Kombination zwei unterschiedlich lange PCR-Fragmente erhalten werden. Somit kann eine Aussage über das Vorhandensein oder Fehlen der RD4-Sequenz gemacht werden (Abbildung 7). Allerdings gilt zu beachten, dass durch diesen Ansatz nur Teilsequenzen der RD4-Region detektiert werden. Die Präsenz der gesamten RD4-Sequenz kann demnach nicht bestätigt werden. Im Rahmen der Erstellung der vorliegenden Publikation wurde durch ein PCR-System für besonders lange Fragmente (longe-range PCR) die RD4-Sequenz des *M. caprae* Allgäu- und des Karwendel-Typs mit flankierenden Primern amplifiziert (Protokoll und Materialien: Tabelle A1; Elektrophoresebild: Abbildung A2). Für den Allgäu-RD4-Typ wurde eine Bande bei ca. 12 kb und für den Karwendel-RD4-Typ bei ca. 8 kb detektiert. Demnach kann die Verwendung eines longe-range PCR-Ansatzes die nur teilweise vorhandene RD4-Sequenz im Genom des Karwendel-RD4-Typus visualisieren.

3 Möglichkeiten und Grenzen der Subtypisierung nach der RD4-Region

Die Ergebnisse dieser Arbeit über die Heterogenität der RD4-Sequenz im Vergleich zu den beiden Genotyping-Methoden Spoligotyping und MIRU-VNTR zeigen, dass die Bestimmung der drei genetischen Diversitäten genutzt werden kann, um *M. caprae* in Subtypen einzuordnen (Discussion, Publikation). Des Weiteren ermöglicht die Subtypisierung anhand der RD4-Variationen im Gegensatz zum Spoligotyping eine Differenzierung zwischen dem Lechtal- und Allgäu-Typ (Table 3, Publikation). Die drei Varianten der RD4 stellen somit einen Locus im Genom von alpinen *M.-caprae*-Isolaten dar, der durch einfache PCR-Methoden drei Subtypen von *M. caprae* leicht und sicher differenzieren kann (Tabelle 6).

Allerdings wird das Genom durch die RD4-Analyse nur in Bezug auf ein genetisches Merkmal in nur einer Genomregion betrachtet. Eine Kombination aus verschiedenen Loci wie im MIRU-VNTR ermöglicht dagegen eine weitaus genauere Differenzierung von *M. caprae* Subtypen. Dies ist von besonderer Bedeutung für den RD4-Typ Allgäu. Denn dieser repräsentiert den in der Literatur beschriebenen RD4-Typ mit der komplett vorhandenen RD4-Sequenz (ARANAZ et al., 2003). Des Weiteren ist zu beachten, dass durch die zwei intern in der RD4-Sequenz ansetzenden PCR-Protokolle (RD4-internal left part und RD4-internal central part) keine

Aussage über das Vorhandensein der gesamten RD4-Sequenz möglich ist. Es werden lediglich Sequenzen aus dem vorderen und mittleren Abschnitt der RD4-Sequenz detektiert (Figure 1, Publikation). Eine Möglichkeit zur Visualisierung der gesamten RD4-Sequenz bietet die Verwendung einer long-range PCR (siehe Abschnitt 2). Die beiden flankierenden PCRs der 5 kb umfassenden Karwendel und 38 kb umfassenden Lechtal Deletion sind dagegen spezifisch für die RD4-Typen Karwendel und Lechtal, da diese Deletionen erstmalig in dieser Arbeit nachgewiesen wurden.

Tabelle 6: RD4-Typisierung anhand der entwickelten vier PCR-Ansätze

RD4-Typ	PCR-Ansatz und Länge des Amplifikates			
	RD4-internal left part (88bp)	RD4-internal central part (1031bp)	flankierend zur Lechtal-Del (700bp)	flankierend zur Karwendel-Del (243bp)
Allgäu	+	+	-	-
Karwendel	-	+	-	+
Lechtal	-	-	+	-

Die entwickelten PCRs zur Differenzierung der Variation in der RD4-Sequenz ermöglichen schnell und einfach nach Erhalt eines kulturellen Isolates die Abgrenzung von *M. bovis* und eine Einordnung in einen der drei Subtypen von *M. caprae*. Diese sind von jedem molekularbiologisch ausgerüsteten Labor einfach durchzuführen. Darüber hinaus kann die Methodik in die Routine von klinischen diagnostisch orientierten Laboren bei Umgang mit nicht infektiösem Material in Form von DNA integriert werden. Dagegen sind Methoden, die aufwendige Hybridisier-Techniken wie das Spoligotyping oder DNA-Sequenzierungen erfordern, nicht so leicht in der Routinediagnostik durchführbar (PARSONS et al., 2002). Um den Arbeitsaufwand durch die vier einzelnen PCR-Ansätze zu verringern, würde sich als Möglichkeit die Entwicklung einer Multiplex-PCR anbieten. Die ca. 250 und 700 bp umfassenden Amplifikate der Lechtal- und Karwendel-Deletion-flankierenden-PCR bieten durch ihren ausreichenden Längenunterschied eine gute Ausgangsposition, um sie in nur einer PCR kombiniert einsetzen zu können. Eine Aussage über den vorliegenden RD4-Typ Karwendel oder Lechtal wäre demzufolge durch die Anwendung einer einzigen PCR möglich. Allerdings stellt die benötigte mykobakterielle DNA aus Kulturen aufgrund des langsamen Wachstums der Mykobakterien und die Notwendigkeit eines Biosicherheitsstandard Stufe 3 (BSL3) Labors für die schnelle Subtypisierung noch einen limitierenden Faktor dar. Eine Differenzierung direkt aus dem Untersuchungsmaterial ist wesentlich schneller, einfacher und eine zusätzliche Absicherung bei einem negativen Kulturergebnis. Die Prüfung der Sensitivität

der hier entwickelten PCR-Protokolle zur Detektion von mykobakterieller DNA direkt aus klinischen Gewebe könnte eventuell zu einer für die Diagnostik ausreichenden Optimierung führen. Dadurch hat diese Studie eine neue Perspektive für eine schnelle und sichere Differenzierung von *M.-caprae*-Isolaten eröffnet.

3.1 Sequenzen im Bereich der RD4-Region der Subtypen Lechtal und Karwendel

Von besonderem Interesse ist, dass die in dieser Arbeit detektierte 38 kb umfassende Deletion im Genom des RD4-Lechtal-Typ, die größte nachgewiesene Deletion im Genom von *M.-caprae*-Isolaten darstellt. Davor waren lediglich Deletionen bis zu 12,7 kb für *M. caprae* bekannt (ARANAZ et al., 2003; BROSCHE et al., 2002). Zudem sind für die deletierte Sequenz im RD4-Lechtal-Typ die ORFs Rv1504 - Rv1531 hinterlegt (Discussion, Publikation). Durch die detektierte Deletion der codierenden Sequenzen ist daher anzunehmen, dass diese nicht essentiell für das Bakterienwachstum sind oder Auswirkungen auf die Wirtsspezifität für Rind oder Rotwild haben (Table 1, Publikation; Tabelle A2).

Zur genauen Analyse der RD4-Varianten Karwendel und Lechtal ist es darüber hinaus entscheidend, dass die Sequenzbereiche der Deletionen nicht nur durch die Visualisierung der Rohdaten aus der Gesamtgenomsequenzierung im Integrative Genomics Viewer (IGV) betrachtet wurden (Figure 1, Publikation). Denn die alleinige Untersuchung der aufeinandergelegten Sequenzrohdaten (mapping) auf das Referenzgenom (Figure 1, Publikation; Teilprojekt Gesamtgenomsequenzierung der Tabelle A3) lässt keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Sequenzen im Bereich der Deletionen zu, die nicht im Referenzgenom enthalten sind. Beispielsweise sind für das Genom von *M. tuberculosis* mobile genetische Elemente in Deletionen beschrieben (BROSCH et al., 1999; COLE et al., 1998). Daher wurden zusätzlich Amplifikationen mit Primern, die die Deletionen flankieren, durchgeführt (Materials and Methods, Publikation). Durch die kombinierte Analyse dieser PCR-Ansätze mit den Daten der Gesamtgenomsequenzierung konnten die flankierenden Sequenzen im Bereich der Deletionen bestimmt werden (Accession no., Table 3, Publikation). Zusätzliche Sequenzen im Bereich der Deletionen können damit ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wird in Bezug auf die Verwendung von Sequenzdaten des NGS vermehrt über die Qualität der Sequenzdaten diskutiert. Im Vergleich zur Sequenzierung nach der Sanger-Methode werden zwar durch eine erhöhte Sensitivität zusätzliche Mutationen in Sequenzen detektiert, jedoch können einige Mutationen bedingt durch eine niedrigere Sequenziergenauigkeit unspezifisch sein (MCCOURT et al., 2013). Außerdem sollte zur sicheren Datenanalyse aus NGS-Ansätzen eine möglichst hohe Übereinstimmung der einzelnen

überlappenden Sequenzen erreicht werden. Jedoch nimmt diese bei einem steigenden GC-Gehalt ab und kann zu einer erschwerten Dateninterpretation führen (GRUMBT et al., 2013). Zudem erschweren repetitive Regionen, die nicht durch einzelne kurze Leselängen (short reads) abgedeckt werden, die Entschlüsselung von Genomsequenzen (HASTIE et al., 2013). Weitere Fehler im Umgang mit NGS Daten können auf der Verwendung von fehlerhaften Genomen beim Mapping oder Kontaminationen durch Fremd-DNA beruhen (GRUMBT et al., 2013). Unter Beachtung dieser Schwierigkeiten können dennoch durch eine Gesamtgenomsequenzierung vielzählige genom-weite genetische Charakteristika detektiert werden, die wertvolle Erkenntnisse zur molekularen Epidemiologie preisgeben (ROETZER et al., 2013).

3.2 Überprüfung neuer *M.-caprae*-Isolate am LGL

Wie bereits in Abschnitt 1 erläutert ist die Analyse von genetischen Variationen notwendig um auf epidemiologische Verteilungsmuster oder sogar den Ursprung einer Infektkette schließen zu können. Des Weiteren stellt die RD4 eine variable Region im Genom von *M. caprae* dar, die nicht essentiell für das Wachstum und die Infektion ist. Andere bislang unbekannte Varianten im Bereich der RD4-Sequenz können demnach nicht ausgeschlossen werden. Aus diesen Gründen wurden anhand der im Rahmen der Publikation etablierten RD4-PCR Protokolle (Tabelle 6) 35 weitere *M.-caprae*-Isolate getestet (Herkunft der Isolate und Anwender der PCR-Ansätze sind in Tabelle A2 hinterlegt; Teilprojekt Herkunft der *M.-caprae*-Isolate der Tabelle A3).

Davon wurden 31 *M.-caprae*-Isolate aus Rotwild, Rind und einem Fuchs im Zeitraum von 2007 - 2013 isoliert. Für diese 31 Isolate konnte durch ihre RD4-Ausprägung eine Einordnung in einen der drei RD4-Typen vorgenommen werden (Tabelle A2). Demnach werden aktuell von insgesamt 43 subtypisierten *M.-caprae*-Isolaten (einschließlich der in der Publikation) zwölf dem Allgäu-, 21 dem Lechtal- und zehn dem Karwendel-RD4-Typ zugeordnet. Die geografische Zuordnung der Karwendel-RD4-Typen ist mit der bereits beschriebenen Verteilung vergleichbar (Figure 2, Publikation). Eine Überschneidung bezüglich der Erlegungsorte von Rotwild kann für die RD4-Typen Lechtal und Allgäu festgestellt werden (Abbildung 8).

Durch den Nachweis der gleichen RD4-Typen in Isolaten aus Rind und Rotwild kann der Erregeraustausch zwischen Nutz- und Wildtieren angenommen werden. Allerdings ist es momentan noch nicht möglich den Ursprungswirt der Infektkette zu identifizieren. Für eine effektive Kontrolle der Tuberkulose ist es entscheidend, dass die genaue Rolle von Wild- und

Nutztieren in der Infektkette bekannt ist. Denn nur so kann die richtige Infektionsquelle bekämpft werden (CORNER et al., 2006). Bedingt können Rückschlüsse über mögliche Übertragungswege anhand der Lokalisation von Läsionen gezogen werden. Dabei kann beim Vorliegen von Läsionen in der Brusthöhle davon ausgegangen, dass eine Infektion durch die Inhalation von erregerhaltigen Aerosolen stattgefunden hat. Dagegen lassen Läsionen in Mesenteriallymphknoten eher auf eine orale Infektion schließen (BIET et al., 2005).

Des Weiteren konnte für das *M.-caprae*-Isolat aus einem Fuchs, der südwestlich im Allgäu erlegt wurde, der RD4-Lechtal-Typ differenziert werden (Tabelle A2). Somit wurde der RD4-Lechtal-Typ neben Rind und Rotwild auch bei Reh und Fuchs nachgewiesen (Abbildung 8; Table 3, Publikation). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Unterscheidung genetischer Variationen der *M.-caprae*-Isolate, um epidemiologische Erkenntnisse gewinnen zu können. Denn es kann angenommen werden, dass aufgrund lokal hoher Tuberkulose-Prävalenz beim Rotwild und dem daraus resultierenden Infektionsdruck ein Übertreten von *M. caprae* auf andere Tierarten stattgefunden hat. Die Möglichkeit der Mykobakterieninfektion durch die Aufnahme der Erreger aus Dachskot oder Kadavern wurde für Ratten bereits beschrieben (LITTLE et al., 1982).

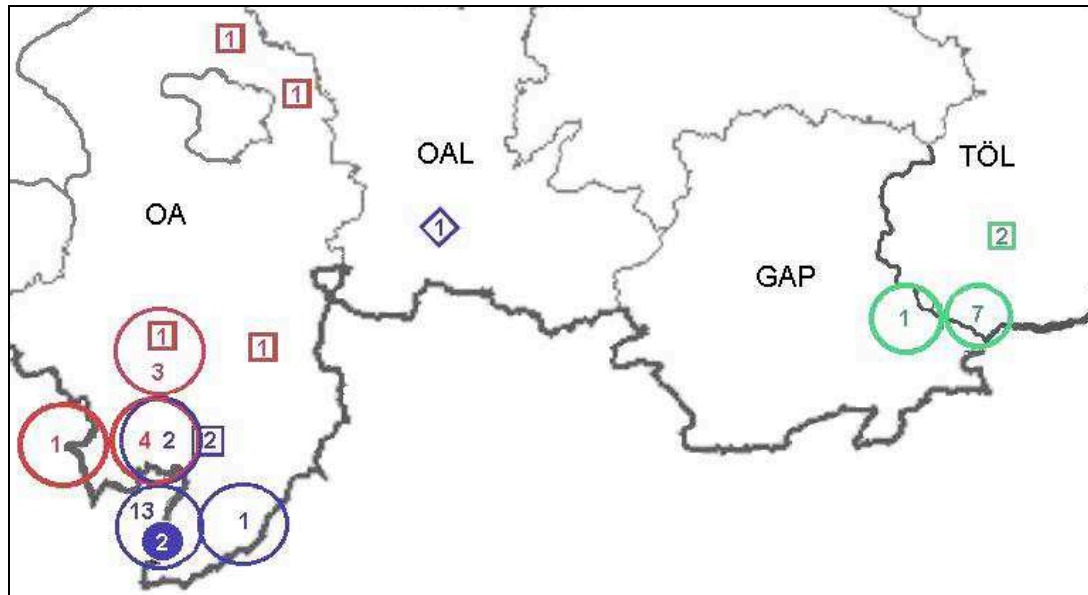


Abbildung 8: geografische Verteilung 43 RD4-typisierter *M.-caprae*-Isolate

Allgäu-Typ: ■ Lechtal-Typ: ■ Karwendel-Typ: ■

Rotwild: ○ Rind: □ Schaf: ◇ Reh und Fuchs: ●

Die Ziffern in den Symbolen geben die Anzahl der typisierten *M.-caprae*-Isolate an

OA = Oberallgäu OAL = Ostallgäu

GAP = Garmisch - Patenkirchen TÖL = Bad Tölz - Wolfratshausen

Für ein *M.-caprae*-Isolat 13/Rd35877 aus einem Rind, das ursprünglich aus Rumänien stammte, konnte keine Subtypisierung in einen der drei beschriebenen RD4-Typen vorgenommen werden (Tabelle 7). Das Ergebnis der beiden intern liegenden RD4-PCRs stimmt mit dem des Karwendel-RD4-Typ überein. Jedoch konnte mit dem PCR-Protokoll, das die 5-kb-Deletion des Karwendel-Typ flankiert, kein Amplifikat erzeugt werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: RD4-PCR Ergebnisse für vier *M.-caprae*-Isolate aus Rindern im Vergleich zu den RD4-Typen Allgäu, Karwendel und Lechtal

Stamm-ID	Herkunft	RD4-internal left part (88bp)	RD4-internal central part (1031bp)	flankierend zur Lechtal-Del (700bp)	flankierend zur Karwendel-Del (243bp)	Spoligo- type
12/Rd90046	Mühldorf	+	+	-	-	n.d.
13/Rd35877	Rumänien	-	+	-	-	n.d.
MI12/10775	Spanien	+	+	-	-	SB0157*
MI12/08124	Spanien	+	+	-	-	SB0416*
RD4-Typen:						
Allgäu	Oberallgäu	+	+	-	-	SB0418
Karwendel	Tölz	-	+	-	+	SB2174
Lechtal	Oberallgäu	-	-	+	-	SB0418

* DNA und Spoligotype-Informationen wurden von Frau Prof. Dr. Alicia Aranaz zur Verfügung gestellt

n.d. = nicht durchgeführt

Dies lässt vermuten, dass eine von der Karwendel-Deletion abweichende, weitere Deletion im vorderen Teil der RD4-Sequenz bei diesem *M.-caprae*-Isolat vorliegen könnte. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung in der Studie von Rodríguez et al. Zur Detektion der RD4-Sequenz im vorderen Teil der RD4-Region wurde ein PCR-Ansatz mit drei Primern verwendet (Abschnitt 2). Dabei zeigt ein 545 bp umfassendes Amplifikat die Präsenz der RD4-Sequenz im vorderen Teil der RD4-Region an. Dagegen weist ein 210 bp umfassendes Amplifikat auf ein Fehlen der RD4-Sequenz hin. Jedoch wurde für ein *M.-caprae*-Isolat aus einem Rind, welches ursprünglich aus Osteuropa stammte, ein 340 bp langes Fragment erzeugt. Rückschlüsse auf die An- oder Abwesenheit der RD4-Sequenz konnten selbst durch eine Sequenzierung des Amplifikates für dieses Isolat nicht getroffen werden (RODRÍGUEZ et al., 2011). Weder beim Lechtal- noch Karwendel-RD4-Typ liegt eine Deletionsgröße vor, bei der ein 340 statt 545 bp umfassendes Fragment hätte entstehen können. Aufgrund der hohen genetischen Variabilität im Bereich der RD4-Region kann von einer erhöhten Deletionsrate dieses Locus ausgegangen werden. Weitere Varianten sind demnach

nicht auszuschließen. Somit kann spekuliert werden, dass für manche *M.-caprae*-Isolate weitere, bisher unbekannte RD4-Typen identifiziert werden könnten.

Zur Überprüfung eventuell noch unbekannter genetischer Variationen in der RD4-Region wurde eine RD4-Subtypisierung mit DNA von zwei *M.-caprae*-Stämmen aus spanischen Rindern durchgeführt. Die internen Sequenzbereiche der RD4-Region wurden wie für den Allgäu-RD4-Typ detektiert (Tabelle 7). Demnach weisen die spanischen Isolate das gleiche Reaktionsmuster in den PCR-Ansätzen wie der RD4-Allgäu-Typ auf. Eine Differenzierung der beiden spanischen Isolate untereinander, wie auch zum RD4-Allgäu-Typ ist nur anhand des Spoligotype möglich (Tabelle 7). In diesem Zusammenhang ist zu betonen, dass die Methodik des Spoligotyping jedoch keine Möglichkeit der Differenzierung für den RD4-Allgäu- und Lechtal-Typ bietet, denn beide *M.-caprae*-Subtypen zeigen im Spoligotyping das SB0418-Muster (Tabelle 7). Dies verdeutlicht, dass eine detailliertere Subtypisierung durch eine Kombination von verschiedenen Loci im mykobakteriellen Genom erzielt werden kann.

Dies belegt auch die Untersuchung des Isolates 12/Rd90046 eines Rindes aus dem Landkreis Mühldorf. Das Isolat weist die gleiche RD4-PCR-Reaktivität wie der RD4-Typ Allgäu auf (Tabelle 7). Erst eine weitere Analyse mittels MIRU-Typing in zwölf Loci ermöglicht eine Differenzierung (Teilprojekt Genotyping der Tabelle A3). Die Kopienanzahlen in den MIRU-Loci des Isolates entsprechen keinem der drei RD4-Subtypen (Tabelle 8). Somit stellt das Isolat 12/Rd90046 einen weiteren bis dahin noch nicht nachgewiesenen Genotypen in Bayern dar. Dieses *M.-caprae*-Isolat kann auch nicht in Verbindung mit den bis jetzt genotypisierten Tuberkulosefunden aus Wild- und Nutztieren im Oberallgäu und dem Karwendelgebirge gebracht werden.

Tabelle 8: Vergleich der MIRU-Typing Ergebnisse eines *M.-caprae*-Isolates aus einem Rind (Mühldorf 12/Rd90046) und den RD4-Typen Lechtal, Allgäu und Karwendel

Genotype	Kopienanzahl je MIRU-Locus											
12/Rd90046	2	2	6	4	2	4	2	6	3	4	2	2
Lechtal	2	2	6	4	2	4	2	4	3	3	2	2
Allgäu	2	3	5	4	2	4	2	5	3	4	2	2
Karwendel	2	3	6	4	2	1	2	5	3	5	2	2
MIRU-Loci	2	4	10	16	20	23	24	26	27	31	39	40

unterschiedliche Kopienanzahl im jeweiligen Locus: 

4 Ausblick

Aufgrund der in dieser Studie nachgewiesenen Heterogenität in der RD4-Sequenz alpiner *M. caprae*-Isolate ist eine sichere Differenzierung von *M. bovis* von *M. caprae* anhand einer fehlenden RD4-Sequenz nicht möglich. Soll eine Differenzierung von MTC-Erregern über den RD4-Locus durch PCR erfolgen, ist ein entsprechendes Primer-Design im Hinblick auf die jetzt bekannten RD4-Variationen nötig. Ansonsten kann die Verwendung von Primer-Sequenzen, die nicht an die Deletionen der *M. caprae*-Isolate angepasst sind, zu einer falschen Speziesdifferenzierung führen (Abschnitt 2). Die im Mai 2013 neu veröffentlichte Version der amtlichen Methodensammlung des FLI empfiehlt erstmals zwei Differenzierungs-PCRs für *M. bovis* und *M. caprae*. Der Nachweis der RD4-Deletion wird als selektives Charakteristikum für *M. bovis* angegeben. Dazu wird ein PCR-Ansatz empfohlen, bei dem der forward Primer und die Sonde Sequenzen vor und der reverse Primer Sequenzen vor und hinter der RD4-Deletion im Genom von *M. bovis* detektieren (Abbildung 9) (FLI, 2013; TAYLOR et al., 2007b). Die bis jetzt in dieser Arbeit bestätigten Deletionen der RD4-Sequenz im Genom von *M. caprae* würde demnach keine falschen Ergebnisse liefern. Allerdings können weitere RD4-Variationen, die zu einer falschen *M. bovis* Differenzierung führen könnten, nicht ausgeschlossen werden.

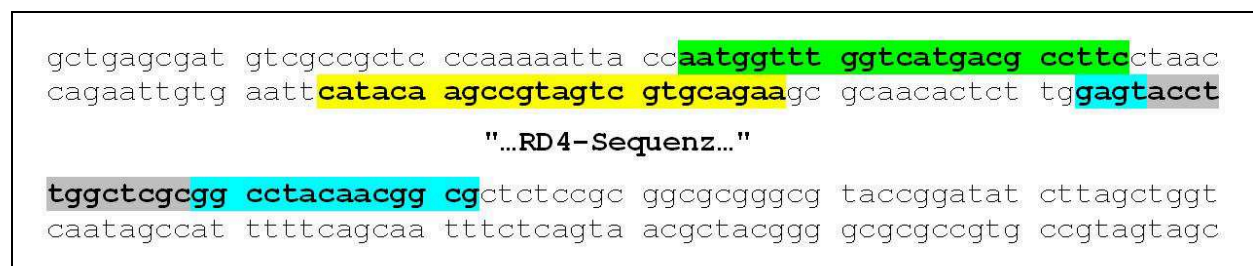


Abbildung 9: Lage der Primer und Sonde der RD4-PCR der amtlichen Methodensammlung

Abgebildet ist die Sequenz von *M. tuberculosis* H37Rv in 5'-3'

Die Sequenz stammt aus der GenBank, accession number CP003248

forward Primer: Sonde: reverse Primer:

Sequenzabschnitte der RD4:

Zur Identifizierung von *M. caprae* wird ein modifizierter PCR-Ansatz von Reddington et al. (2011) empfohlen, der anhand einer Sonde einen *M. caprae* spezifischen SNP detektiert (FLI, 2013). Dieser SNP wurde in insgesamt 17 *M. caprae*-Isolaten, einschließlich der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Publikation, bestätigt (Results, Publikation).

Generell kann durch die Detektion möglichst vieler genetischer Diversitäten eine erhöhte Spezifität für die Speziesdifferenzierung erzielt werden. Darüber hinaus können detaillierte Informationen zur Subtypisierung gewonnen werden. Nur dadurch können epidemiologische Zusammenhänge und Aussagen zur bakteriellen Evolution relativ sicher gewagt werden. Deswegen wäre unter anderem zur genaueren Klärung des Erregeraustausches zwischen Rind und Rotwild und bei Wirtswechsel eine Gesamtgenomsequenzierung weiterer *M.-caprae*-Isolate relevant. Von Bedeutung sollte dabei nicht nur der Vergleich der RD4-Sequenz sein, sondern auch die Analyse anderer genetischer Loci und der Vergleich von SNPs in den Gesamtgenomen (<http://www.vetscite.org/publish/items/008201/index.html>; ROETZER et al., 2013). Durch derartige molekularbiologische Feincharakterisierungen könnten die Genomverwandtschaften der *M.-caprae*-Erreger untereinander und vergleichend zu *M. bovis* noch besser identifiziert werden. Die daraus resultierenden Erkenntnisse könnten Rückschlüsse auf die Richtung der Erregerübertragung und die Übertragungswege zulassen, die für die effektive Bekämpfung der Rindertuberkulose essentiell sind.

Des Weiteren wäre eine kontinuierliche Tuberkuloseüberwachung auch bei Wildtieren in der Alpenregion wünschenswert. Eine Kontrolle ist zum einen über eine sorgfältige Tierkörperbeschau von erlegten Wildtieren möglich. Zum anderen bieten Monitoring-Programme, angepasst an die Seuchensituation beim Rind, Möglichkeiten zur Überwachung und Beurteilung der Tuberkuloseverbreitung bei Wildtieren. Ein bayerisches Tuberkulose-Rotwild-Monitoring entlang der gesamten bayerischen Alpenkette wurde mit Beginn des Jahres 2013 durch das bayerische StMUG initiiert (LGL, 2013).

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Rindertuberkulose stellt ein weltweites Problem dar, insbesondere wenn ein Wildtierreservoir existiert und ein Ergeraustausch zwischen Rindern und Wildtieren auf der Weide eine permanente Infektionsgefahr darstellt. *M. bovis* und *M. caprae* sind dabei die relevanten Erreger für Nutz- und Wildtiere. In der bayerischen Alpenregion Allgäu, in der sehr viele Rinder auf Sommerweiden aufgetrieben werden, kann ein geringer aber stetiger Anstieg von Rindertuberkulosefällen registriert werden. Als Erreger wird bei diesen Ausbrüchen *M. caprae* nachgewiesen. *M. caprae* Infektionen können ebenfalls beim Rotwild in den Alpenregionen von Österreich, Italien und Bayern seit den letzten fünf Jahren vermehrt dokumentiert werden. Infolgedessen steht in diesen Regionen immer wieder eine mögliche Erregerübertragung zwischen Rind und Rotwild zur Diskussion.

Durch epidemiologische Überwachungsprogramme, die epidemische Trends dokumentieren, kann eine effiziente Seuchenbekämpfung erreicht werden. Zu diesem Zweck sind DNA-Fingerprinting Techniken eine wertvolle Methode um die Erreger des *Mycobacterium tuberculosis* Komplex (MTC) zu differenzieren. Die molekulare Differenzierung von mykobakteriellen Isolaten beruht häufig auf dem MIRU-VNTR oder Spoligotyping. Allerdings können diese zeitaufwendigen komplexen Methoden nicht in die Routinediagnostik integriert werden. Durch vergleichende Sequenzanalysen von mykobakteriellen Genomen wurden spezifische Unterscheidungsregionen (region of difference, RD) nachgewiesen. Diese sind in den Genomen der Mitglieder des MTC in verschiedener Anzahl vorhanden oder deletiert. *M. caprae* und *M. bovis* weisen dabei weitgehend gleiche Deletionen auf, unterscheiden sich aber in der RD4-Region. Die RD4-Region stellt eine 12,7 kb umfassende Deletion dar, die bislang als Charakteristikum im Genom von *M. bovis* angesehen wurde. Hingegen sollte im Genom von *M. caprae* die RD4-Sequenz gut konserviert vorliegen und damit eine Differenzierungsmöglichkeit von *M. caprae* und *M. bovis* bieten.

In dieser Studie wurde die RD4-Region zur Identifizierung und Charakterisierung von *M. caprae* analysiert. Dazu wurden zwölf bayerische *M.-caprae*-Isolate aus Wild- und Nutztieren untersucht. Zur Datenanalyse wurden konventionelle PCR-Ansätze, Sequenzanalysen der Amplifikate und Daten aus Gesamtgenomsequenzierungen verwendet.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die RD4-Sequenz im Gegensatz zu der bisherigen Annahme nicht genetisch einheitlich in den bayerischen *M.-caprae*-Isolaten konserviert ist. Mindestens drei unterschiedliche Varianten der, die RD4-Region kennzeichnenden, spezifischen Sequenzen konnten in den untersuchten Isolaten bestätigt werden. Entsprechend

des geografisch regionalen Auftretens der RD4-Variation wurden die Isolate in die Subtypen Allgäu, Lechtal und Karwendel eingeteilt. Die Sequenzanalyse der RD4-Region hat gezeigt, dass die gesamte RD4-Sequenz im Allgäu-RD4-Typ konserviert vorhanden ist, jedoch nicht in den Subtypen Karwendel und Lechtal. In der RD4-Sequenz des Karwendel-Typus liegt eine 5-kb-Deletion vor, die den vorderen Teil der RD4-Region in 5'-3' betrifft. Der Lechtal-Typ weist eine 38-kb-Deletion auf, in der die gesamte RD4-Sequenz enthalten ist. Des Weiteren wurden in dieser Studie vier PCR-Ansätze zur Differenzierung von *M. caprae*-Isolaten in die drei RD4-Typen entwickelt. Diese PCR-Ansätze sind leicht anzuwenden und können zeitaufwendige Hybridisieretechniken wie das Spoligotyping ersetzen, wodurch sie einfach in die mykobakterielle Routinediagnostik zu integrieren sind.

Aufgrund der erstmalig nachgewiesenen Heterogenität der RD4-Region sind RD4-basierende Differenzierungsansätze von *M. caprae* und *M. bovis* nur unter Vorbehalt zu verwenden. Die Untersuchung ausländischer *M. caprae*-Isolate deutet zudem darauf hin, dass abweichende RD4-Deletionen in anderen *M. caprae*-Isolaten möglich sind. Auf der anderen Seite ermöglichen die nachgewiesenen genetischen Variationen der RD4-Sequenz eine Subtypisierung von alpinen *M. caprae*-Isolaten und weisen eine genetische Stabilität für mindestens drei Jahre auf. Darüber hinaus deuten die RD4-Varianten auf die geografische Herkunft der *M. caprae*-Isolate hin. Zudem belegt der Nachweis der drei *M. caprae* RD4-Typen bei Rind und Rotwild einen Erregeraustausch zwischen Nutz- und Wildtieren. Jedoch kann damit der ursprüngliche Wirt der Stämme nicht ermittelt werden.

Diese Studie beschreibt erstmalig die genetische Variation in der RD4-Region von bayerischen *M. caprae*-Isolaten und liefert durch die Identifizierung der RD4-Varianten Informationen zum epidemiologischen Hintergrund der Rinder- und Wildtiertuberkulose in Bayern. Des Weiteren ermöglicht diese Studie neue Perspektiven für eine Subtypisierung von *M. caprae*-Isolaten. Neue Entwicklungen wie das "Next Generation Sequencing" (NGS) erlauben auf Gesamtgenom-Sequenzebene tiefere Einblicke in genomweite Charakteristika, unter anderem über Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs). Auf diese Weise wird eine verbesserte molekulare Epidemiologie ermöglicht. Erste Ansätze dazu werden in dieser Arbeit vorgestellt.

VI SUMMARY

Bovine tuberculosis is still global problem, particularly when a wildlife reservoir exists and tuberculosis transmission from wildlife to cattle and cattle to wildlife on the pasture is a permanent danger. *M. bovis* and *M. caprae* are the most relevant pathogens for livestock and wildlife. The Bavarian alpine region Allgäu, an area with plenty of cattle summer pastures a low but recurrent incidence of bovine tuberculosis is registered. In this region the infection in cattle is stably caused by *M. caprae*. In the alpine regions of Austria, Italy and Bavaria cases of *M. caprae* infection have been increasingly reported in red deer during the last five years. Therefore a deer-cattle transmission is a permanent matter of debate in these regions.

However an efficient disease control can only be achieved by epidemiological surveillance systems capable to accurately report epidemic trends. To fulfill this goal DNA fingerprinting methods are a powerful tool for the differentiation of pathogens within the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). Molecular characterization of mycobacteria isolates is often based on MIRU-VNTR or spoligotyping. But these tests are complex and time-consuming and may not be performed in routine diagnostic procedures. Comparative genomic studies with mycobacterial genome sequences have identified several genomic regions of difference (RD) which are present or absent in the genomes of the members within the MTC. *M. caprae* and *M. bovis* isolates almost display the same RD deletions however show a discrepancy in the RD4 region. RD4 is a 12.7 kb deletion previously characterized unique in the genome of *M. bovis*. In *M. caprae* genomes RD4 is to be expected to be highly conserved and therefore RD4 should be exploitable to differentiate *M. caprae* from *M. bovis*.

In this study the RD4 sequence was analyzed for the identification and characterization of *M. caprae*. Genetic characteristics of RD4 region were evaluated in twelve *M. caprae* isolates from livestock and wildlife in Bavaria. Conventional PCR strategies, sequence analysis of PCR fragments and data from a next-generation sequencing approach were utilized.

The results of this study demonstrate that RD4 sequence is genetically not uniform in alpine *M. caprae* isolates as assumed to date. At least three different RD4 variants can be found in this isolates. According to the origin and the identified RD4 differences the isolates were divided in Allgäu-, Lechtal- and Karwendel-type. Sequence analyses of the RD4 region proved that the completely sequence is conserved in *M. caprae* isolates of the Allgäu-type but not in the Karwendel- and Lechtal-type. The RD4 region of the Karwendel-type shows a 5-kb deletion within the forward part of the RD4-sequence in 5'-3' direction. A 38-kb deletion in Lechtal-type genome comprises the whole RD4 sequence. To distinguish the three RD4 types of

M. caprae, four conventional PCR protocols were designed in this study. The developed PCR protocols may replace time-consuming hybridizations techniques such as spoligotyping and can easily be implemented in the routine mycobacterium diagnostic procedures.

Hence, the heterogeneous genomic region of RD4 is critical for RD4-based differentiation of *M. caprae* from *M. bovis*. In addition the analysis of foreign *M. caprae* isolates suggests that more RD4-variants may exist in other *M. caprae* isolates. However, the observed genetic variants of the RD4 allow the identification of three alpine *M. caprae* subtypes. Notably, the three subtypes have so far shown a genetic stability ever at least three years. Certain RD4 variants may be indicative for a geographical origin of *M. caprae* isolates. The presence of three subtypes in cattle and red deer demonstrates tuberculosis transmission between livestock and wildlife. However, the index host of the isolates cannot be predicted.

This study for the first time describes the genetic variation within the RD4 region of alpine *M. caprae* isolates. The identification of the RD4-variants offers a better understanding of the epidemiological background of bovine and wildlife tuberculosis in Bavaria. Furthermore this study shows new perspectives for a differentiation of *M. caprae* subtypes. New developments such as "next generation sequencing" (NGS) offer more detailed and genome-wide characteristics, for example single nucleotide polymorphisms (SNPs), for improved molecular epidemiology. A first approach in this direction is presented in this work.

VII LITERATURVERZEICHNIS

Achkar JM, Ziegenbalg A. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value. Clin Vaccine Immunol. 2012; 19(12):1898-1906.

Adachi T, Mizuuchi M, Robinson EA, Appella E, O'Dea MH, Gellert M, Mizuuchi K. DNA sequence of the E. coli gyrB gene: application of a new sequencing strategy. Nucleic Acids Res. 1987; 15(2):771-784.

Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerg. Infect. Dis. 2010; 16:1296-1299.

American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. American Thoracic Society. MMWR Recomm Rep. 2000; 49(RR-6):1-51.

Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A, Blazquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G, Dominguez L. *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.*: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999; 49Pt3:1263-1273.

Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J. Syst. Evol. Microbiol. 2003; 53:1785-1789.

Arlehamn CS, Sidney J, Henderson R, Greenbaum JA, James EA, Moutaftsi M, Coler R, McKinney DM, Park D, Taplitz R, Kwok WW, Grey H, Peters B, Sette A. Dissecting mechanisms of immunodominance to the common tuberculosis antigens ESAT-6, CFP10, Rv2031c (hspX), Rv2654c (TB7.7), and Rv1038c (EsxJ). J. Immunol. 2012; 188(10):5020-5031.

Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2004; 8(8):924-937.

Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. Vaccine. 1999; 17(7-8):915-922.

- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999; 284(5419):1520-1523.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin 2003. S.161-164.
- Bezoz J, de Juan L, Romero B, Alvarez J, Mazzucchelli F, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 133(2-4):269-275.
- Biet F, Boschirolu ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Veterinary Research*. 2005; 36:411-436.
- Bifani P, Moghazeh S, Shopsis B, Driscoll J, Ravikovitch A, Kreiswirth BN. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(9):3200-3204.
- Bishai WR, Dannenberg AM, Parrish N, Ruiz R, Chen P, Zook BC, Johnson W, Boles JW, Pitt ML. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 and H37Rv in rabbits evaluated by Lurie's pulmonary tubercle count method. *Infect. Immun.* 1999; 67:4931-4934.
- Blaas SH, Böhm S, Martin G, Erler W, Glück T, Lehn N, Naumann L. Pericarditis as primary manifestation of *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae*. *Diagn Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 47:431-433.
- Boniotti M, Gorla M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A, Tisato E, Zanoni M, Zoppi S, Dondo A, Tagliabue S, Bonora S, Zanardi G, Pacciarini ML. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(3):636-644.
- Bose M, Chander A, Das RH. A rapid and gentle method for the isolation of genomic DNA from mycobacteria. *Nucleic Acids Research*. 1993; 21:2529-2530.
- Brosch R, Philipp WJ, Stavropoulos E, Colston MJ, Cole ST, Gordon SV. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect. Immun.* 1999; 67(11):5768-5774.

- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002; 99(6):3684-3689.
- Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology. 2002; 148(Pt 10):2967-2973.
- Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. J. Exp. Med. 1995; 181:257-270.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998; 393(6685):537-544.
- Cole ST. Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. FEBS Lett. 1999; 452(1-2):7-10.
- Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology. 2002; 148:2919-2928.
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. PLoS One. 2009; 4:e7815.
- Conner MM, Ebinger MR, Blanchong JA, Cross PC. Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008; 1134:146-172.
- Cook HC. Origins of ... tinctorial methods in histology. J. Clin. Pathol. 1997; 50(9):716-720.
- Corner LA. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. Vet Microbiol. 2006; 112(2-4):303-312.
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HFAK, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium*

bovis in Developing Countries. Emerging Infect. Dis. 1998; vol.4

Cousins DV, Skuce RA, Kazwala RR, van Embden JD. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. International union Against Tuberculosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animal Subsection. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 1998; 2:471-478.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003; 53(Pt 5):1305-1314.

Cunha MV, Monteiro M, Carvalho P, Mendonça P, Albuquerque T, Botelho A. Multihost tuberculosis: insights from the portuguese control program. Vet. Med. Int. 2011; 2011:795165.

De Lisle GW, Mackintosh CG, Bengis RG. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. OIE Revue Scientifique et Technique. 2001; 20(1):86-111.

Deretic V, Philipp W, Dhandayuthapani S, Mudd MH, Curcic R, Garbe T, Heym B, Via LE, Cole ST. *Mycobacterium tuberculosis* is a natural mutant with an inactivated oxidative-stress regulatory gene: implications for sensitivity to isoniazid. Mol. Microbiol. 1995; 17(5):889-900.

Diel R, Loytved G, Nienhaus A, Castell S, Detjen A, Geerdes-Fenge H, Haas W, Hauer B, Königstein B, Maffei D, Magdorf K, Priwitzer M, Zellweger JP, Loddenkemper R. Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose. Pneumologie 2011; 65:359-378.

Duarte EL, Domingos M, Amado A, Botelho A. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. Vet. Microbiol. 2008; 130(3-4):415-421.

Elwood RK, Cook VJ, Hernández-Garduño E. Risk of tuberculosis in children from smear-negative source cases. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2005; 9(1):49-55.

Entscheidung 1999/467/EG. Entscheidung der Kommission vom 15. Juli 1999 über die amtliche Anerkennung der Tuberkulosefreiheit von Rinderbeständen in bestimmten Mitgliedstaaten und Regionen der Mitgliedstaaten und zur Aufhebung der Entscheidung 97/76/EG. 16.07.1999.

Ereqat S, Nasereddin A, Levine H, Azmi K, Al-Jawabreh A, Greenblatt CL, Abdeen Z, Bargal GK. First-Time Detection of *Mycobacterium bovis* in Livestock Tissues and Milk in the

West Bank, Palestinian Territories. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013; 7(9):e2417.

Erlor W, Martin G, Sachse K, Naumann L, Kahlau D, Beer J, Bartos M, Nagy G, Cvetnic Z, Zolnir-Dovc M, Pavlik I. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis subsp. caprae* isolates from central Europe. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:2234-2238.

Espie IW, Hlokwé TM, Gey van Pittius NC, Lane E, Tordiffe AS, Michel AL, Muller A, Kotze A, van Helden PD. Pulmonary infection due to *Mycobacterium bovis* in a black rhinoceros (*Diceros bicornis minor*) in South Africa. J. Wildl. Dis. 2009; 45:1187-1193.

Espinosa de los Monteros LE, Galán JC, Gutiérrez M, Samper S, García Marín JF, Martín C, Domínguez L, de Rafael L, Baquero F, Gómez-Mampaso E, Blázquez J. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. J. Clin. Microbiol. 1998; 36(1):239-242.

Fine AE, Bolin CA, Gardiner JC, Kaneene JB. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. Vet. Med. Int. 2011; 2011:765430.

Firdessa R, Tschopp R, Wubete A, Sombo M, Hailu E, Erenso G, Kiros T, Yamuah L, Vordermeier M, Hewinson RG, Young D, Gordon SV, Sahile M, Aseffa A, Berg S. High Prevalence of Bovine Tuberculosis in Dairy Cattle in Central Ethiopia: Implications for the Dairy Industry and Public Health. PLoS One. 2012; 7(12):e52851.

Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs JW, Venter JC, Fraser CM. Whole - genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J. Bacteriol. 2002; 184:5479-5490.

FLI. Jahresbericht 2009. 2010; S.58-63.

FLI. Tiergesundheitsjahresbericht 2011. 2012; S.100-103.

FLI. Amtliche Methodensammlung Mai 2013. 2013; S.438-457.

Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. Infect. Immun. 2001; 69(7):4195-4201.

Fritsche A, Engel R, Buhl D, Zellweger JP. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2004; 8(7):903-904.

Frothingham R, Meeker OC. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology 1998; 144:1189-1196.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc. Natl .Acad. Sci. USA. 2003; 100:7877-7882.

Gavin W, Broughan J, Chambers M, Clifton-Hadley R, Crawshaw T, de la Fuente J, Delahay R, Gavier-Widen D, Gortazar C, Hewinson G, Jackson V, Martín-Hernando MP, Neimanis A, Salguero FJ, Vicente J, Ward A, McDonald R. Scientific Review on Tuberculosis in wildlife in the EU. EFSA-Q- 2008-04992. 2009; <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/12e.htm>.

Gerstmair EM. Validierung molekularbiologischer und immunologischer Nachweisverfahren für die Tuberkulose bei Rindern und Tuberkulosemonitoring beim Rotwild. Dissertation, Tierärztliche Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München. 2011.

Goguet de la Salmonière YO, Li HM, Torrea G, Bunschoten A, van Embden J, Gicquel B. Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1997; 35(9):2210-2214.

Gonzalez-Y-Merchand JA, Garcia MJ, Gonzalez-Rico S, Colston MJ, Cox RA. Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. Journal of Bacteriology 1997; 179:6949-6958.

Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. Mol. Microbiol. 1999; 32(3):643-655.

Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. Vet. Microbiol. 2006; 112(2-4):171-179.

Gortázar C, Torres MJ, Vicente J, Acevedo P, Reglero M, Fuente J, Negro JJ, Aznar-Martín J. Bovine Tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: The Role of Wild Ungulates as Disease Reservoirs in the Last Iberian Lynx Strongholds. PLoS ONE. 2008; 3(7):e2776.

- Groenen PMA, Bunschoten AE, van Soolingen D, Van Embden JD. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel method. *Mol. Microbiol.* 1993; 105:1057-1065.
- Grumbt B, Eck SH, Hinrichsen T, Hirv K. Diagnostic applications of next generation sequencing in immunogenetics and molecular oncology. *Transfus. Med. Hemother.* 2013; 40(3):196-206.
- Guérin C. The history of BCG: early history. In: Rosenthal SR, editors. *BCG Vaccination Against Tuberculosis*. London, J&H Churchill, 1957; p:48-57.
- Gutierrez M, Samper S, Jimenez MS, van Embden JD, Marin JF, Martin C. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:3328-3330.
- Haddad N, Ostyn A, Karoui C, Masselot M, Thorel MF, Hughes SL, Inwald J, Hewinson RG, Durand B. *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(10):3623-3632.
- Halse TA, Escuyer VE, Musser KA. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(7):2562-2567.
- Hansen N, Seiler C, Rumpf J, Kraft P, Dlaske H, Abele-Horn M, Muellges W. Human Tuberculous Meningitis Caused by *Mycobacterium caprae*. *Case Rep. Neurol.* 2012; 4(1):54-60.
- Harrington JR, Karlson AG. Destruction of Various Kinds of Mycobacteria in Milk by Pasteurization. *Appl Microbiol.* 1965; 13(3):494-495.
- Hastie AR, Dong L, Smith A, Finklestein J, Lam ET, Huo N, Cao H, Kwok PY, Deal KR, Dvorak J, Luo MC, Gu Y, Xiao M. Rapid genome mapping in nanochannel arrays for highly complete and accurate de novo sequence assembly of the complex *Aegilops tauschii* genome. *PLoS One.* 2013; 8(2):e55864.
- Hermans PWM, van Soolingen D, Bik EM, de Haas PEW, Dale JW, van Embden JDA. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 1991; 59:2695-2705.

- Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman MW, Small PM. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101:4871-4876.
- Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavliki I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Veterinari Medicina*. 2006; 51:180-192.
- Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(4):1637-1650.
- Huard RC, Fabre M, de Haas P, Lazzarini LC, van Soolingen D, Cousins D, Ho JL. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* 2006; 188:4271-4287.
- Hurley SS, Splitter GA, Welch RA. Rapid lysis technique for mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25:2227-2229.
- Jánosi S, Rónai Z, Csivincsik A, Aranaz A, Domínguez L, Romero B, Rodríguez S. Relationship between wildlife and bovine TB in Hungary on the evidence of genotyping data. Abstract Workshop of European Project VENoMYC SSPE-CT-2004-501903. 24.-25. März 2009. Madrid, Spanien
- Jenkins HE, Woodroffe R, Donnelly CA. The effects of annual widespread badger culls on cattle tuberculosis following the cessation of culling. *Int. J. Infect. Dis.* 2008; 12(5):457-465.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:907-914.
- Karlson AG, Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int. J. Syst Bacteriol.* 1970; 20:273-282.
- Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their *gyrB* Sequences. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):301-308.
- Katti MK. Pathogenesis, diagnosis, treatment, and outcome aspects of cerebral tuberculosis. *Med. Sci. Monit.* 2004; 10:RA215-RA229.

Kiers A, Klarenbeek A, Mendelts B, van Soolingen D, Koeter G. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2008; 12:1469-1473.

Köhler H, Hoffmann B, Moser I, Möbius P. Novel probe-based real-time PCR for rapid diagnosis of bovine tuberculosis in tissue samples with suspect lesions. Poster auf der Tagung der DVG-FG Bakteriologie und Mykologie vom 22.6. bis 24.6.2010 in Jena.

Kössler J. Bekämpfung der Tuberkulose beim Rotwild im Oberen Lechtal - aktueller Stand, 18. Österreichische Jägertagung 2012, 45-48, ISBN: 978-3- 902559-71-5

Kubica T, Rüsch-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis subsp. caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(7):3070-3077.

Levy-Frebault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992; 42:315-323.

LGL. FAQs zu Tuberkulose. Dokument aktualisiert am: 15.08.2013. abgerufen am 25.09.2013. http://www.lgl.bayern.de/gesundheit/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/tuberkulose/faq_tuberkulose_mensch.htm

Lin B, Wang J, Cheng Y. Recent Patents and Advances in the Next-Generation Sequencing Technologies. Recent Pat. Biomed. Eng. 2008; 2008(1):60-67.

Little TW, Naylor PF, Wilesmith JW. Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. Vet Rec. 1982; 111(24):550-557.

Magdalena J, Supply P, Locht C. Specific Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent Strains of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. J. Clin. Microbiol. 1998; 36(9): 2471-2476.

Majoor CJ, Magis-Escurra C, van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, the Netherlands, 1993-1997. Emerg. Infect. Dis. 2011; 17(3):457-463.

Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P. High-resolution minisatellitebased typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001;

98:1901-1906.

McCorry T, Whelan AO, Welsh MD, McNair J, Walton E, Bryson DG, Hewinson RG, Vordermeier HM, Pollock JM. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. *Vet. Rec.* 2005; 157(20):613-618.

McCourt CM, McArt DG, Mills K, Catherwood MA, Maxwell P, Waugh DJ, Hamilton P, O'Sullivan JM, Salto-Tellez M. Validation of Next Generation Sequencing Technologies in Comparison to Current Diagnostic Gold Standards for BRAF, EGFR and KRAS Mutational Analysis. *PLoS One.* 2013; 8(7):e69604.

Medeiros LS, Marassi CD, Figueiredo EES, Lilenbaum W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41:531-541.

Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J.* 2000; 160(2):92-106.

Meyer S, Naumann L, Landthaler M, Vogt T. Lupus vulgaris caused by *Mycobacterium bovis subspecies caprae*. *Br. J. Dermatol.* 2005; 153:220-222.

Milian Suazo F, Anaya EAM, Gallegos TRM. A review of *M. bovis* BCG protection against TB in cattle and other animals species. *Preventive Veterinary Medicine.* 2003; 58:1-13.

Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(1):74-80.

Müller B, Dürr S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJ, Parsons SD, van Helden PD, Zinsstag J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(6):899-908.

Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P. Mikrobiologische Diagnostik Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York 1992. 2. Auflage. S. 146-147;252-254;398-418.

Niemann S, Harmsen D, Rüsche-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:3231-3234.

Niemann S, Richter E, Rüsche-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of

Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis subsp. caprae* comb. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002; 52:433-436.

Nugent G, Whitford EJ, Yockney I, Perry M, Tompkins DM, Holtslag N, Cross ML. Percutaneous interdigital injection of *Mycobacterium bovis* as a model for tuberculous lesion development in wild brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). J. Comp. Pathol. 2013; 148(1):33-42.

O'Brien DJ, Schmitt SM, Rudolph BA, Nugent G. Recent advances in the management of bovine tuberculosis in free-ranging wildlife. Vet. Microbiol. 2011; 151(1-2):23-33.

Odumeru J, Gao ACS, Raymond M, Mutharia L. Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. Canadian Journal of Veterinary Research. 2001; 65:201-205.

OIE. Bovine tuberculosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2013. 2009, Chapter 2.4.7.:1-16. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tubercle & Lung Disease 1995; 76:1-46.

Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol. 1998; 6(3):107-112.

Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, van Soolingen D, Hale YM, Salfinger M. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:2339-2345.

Pavlik I, Dvorska L, Bartos M, Parmova I, Meliciarek I, Jesenska A, Havelkova M, Slosarek M, Putova I, Martin G, Erler W, Kremer K, Van Soolingen D. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period 1965-2001 studied by spoligotyping. Vet. Med. (Praha). 2002; 47:181-194.

Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. Clin. Infect. Dis. 2009; 49(9):1350-1357.

- Pinsky BA, Banaei N. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex members to the species level. J. Clin. Microbiol. 2008; 46(7):2241-2246.
- Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schönbauer M, Glawischnig W. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis subsp. caprae* in western Austria. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(6):2270-2272.
- Prodinger WM, Brandstätter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschirolu ML, Aranaz A, Nagy G, Cvetnic Z, Ocepek M, Skrypnyk A, Erler W, Niemann S, Pavlik I, Moser I. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(10):4984-4992.
- Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. Mol. Microbiol. 2002; 46(3):709-717.
- Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, van Soolingen D, Barry T. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. PLoS One. 2011; 6(8):e23481.
- Rehren G, Walters S, Fontan P, Smith I, Zarraga, AM. Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) 2007; 87(4):347-359.
- Richter E, Weizenegger M, Rüsch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(6):2672-2675.
- Richter E, Weizenegger M, Fahr AM, Rüsch-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(9):4303-4306.
- Richtlinie 64/432/EWG. Richtlinie des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen (64/432/EWG). In der konsolidierten Fassung vom 01.07.2013.
- RindTbV. Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes. Erstauflage 1972, in der Fassung vom 12. Juli 2013.

RKI. Epidemiologisches Bulletin. Nr.II 2013. 2013a; S.9-16.

RKI. Bericht zur Epideminologie der Tuberkulose in Deutschland für 2011. 2013b; S.48.

Rodríguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. Microbiology. 1995; 141:2131-2138.

Rodríguez E, Sánchez LP, Pérez S, Herrera L, Jiménez MS, Samper S, Iglesias MJL. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2009; 13:1536-1541.

Rodríguez S, Romero B, Bezos J, de Juan L, Alvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, González S, Sáez-Llorente JL, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A, Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. Vet. Microbiol. 2010; 141(1-2):89-95.

Rodríguez S, Bezos J, Romero B, de Juan L, Álvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Javed MT, Sáez-Llorente JL, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. Emerg. Infect. Dis. 2011; 17(3):532-535.

Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Rückert C, Nübel U, Blom J, Wirth T, Jaenicke S, Schuback S, Rüscher-Gerdes S, Supply P, Kalinowski J, Niemann S. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. PLoS Med. 2013; 10(2):e1001387.

Rogall T, Flohr T, Bottger EC. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. J. Gen. Microbiol. 1990; 136(9):1915-1920.

Rolle M, Mayr A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1993. 9. Auflage. S.308-318.

Ryan TJ, Livingstone PG, Ramsey DS, de Lisle GW, Nugent G, Collins DM, Buddle BM. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. Vet. Microbiol. 2006; 112:211-219.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74:5463-5467.

- Santos N, Correia-Neves M, Ghebremichael S, Kallenius G, Svenson SB, Almeida V. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. J. Wildl. Dis. 2009; 45:1048-1061.
- Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Whelan AO, Coad M, Gormley E, Buddle BM, Palmer M, Thacker T, McNair J, Welsh M, Hewinson RG, Oesch B. Bovine tuberculosis: effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. Vet. Immunol. Immunopathol. 2010; 136(1-2):1-11.
- Schoepf K, Prodinger WM, Glawischnig W, Hofer E, Revilla-Fernandez S, Hofrichter J, Fritz J, Köfer J, Schmoll F. A Two-Years' Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in Red Deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. ISRN Vet Sci. 2012; 2012:245138.
- Schürch AC, van Soolingen D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. Infect. Genet. Evol. 2012; 12:602-609.
- Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat. Med. 1996; 2:662-667.
- Skuce RA, Brittain D, Hughes MS, Beck LA, Neill SD. 1994. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:2387-2392.
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16(3):463-496.
- Smith NH, Upton P. Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.Mbovis.org. Infect. Genet. Evol. 2012; 12(4):873-876.
- Smithwick NH. Laboratory manual for acid-fast microscopy. Center for Disease Control. Atlanta. 1976.
- Sola C, Filliol I, Legrand E, Lesjean S, Loch C, Supply P, Rastogi N. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infect. Genet. Evol. 2003; 3:125-133.

- Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Salfinger M. Direct comparison of the genotype MTBC and genomic deletion assays in terms of ability to distinguish between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates and in clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 2008; 46:1854-1857.
- Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 1995; 63(5):1710-1717.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94(18):9869-9874.
- Stahl DA, Urbance JW. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. J. Bacteriol. 1990; 172:116-124.
- Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO, Bates JH. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1995; 151:1267-1268.
- Steenken W, Oatway WH, Petroff SA. Biological studies of the tubercle bacillus. J. Exp. Med. 1934; 60:515-543.
- Stewart LD, McNair J, McCallan L, Gordon A, Grant IR. Improved Detection of *Mycobacterium bovis* Infection in Bovine Lymph Node Tissue Using Immunomagnetic Separation (IMS)-Based Methods. PLoS One. 2013; 8(3):e58374.
- Stucki D, Malla B, Hostettler S, Huna T, Feldmann J, Yeboah-Manu D, Borrell S, Fenner L, Comas I, Coscollà M, Gagneux S. Two new rapid SNP-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. PLoS One 2012; 7:e41253.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fork AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science. 1994; 263:678-681.
- Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol. Microbiol. 1997; 26(5):991-1003.

- Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent C, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 2000; 36(3):762-771.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:3563-3571.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(12):4498-4510.
- Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:566-569.
- Tar SY, Bozdemir B, Gurel MS, Bilgin FU, Baran MF, Demirkesen C. *Mycobacterium bovis caprae*: a rare agent of lupus vulgaris. *Clin. Exper. Dermatol.* 2009; 34:532-533.
- Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology.* 2007a; 153:1243-1249.
- Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet. Res.* 2007b; 3:12.
- Thakur A, Sharma M, Katoch VC, Dhar P, Katoch RC. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. *Indian J. Microbiol.* 2012; 52(2):289-291.
- Thom M, Howard C. Consequence of prior exposure to environmental mycobacteria on BCG vaccination and diagnosis of tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88(4):324-334.
- TierSeuchAnzV. Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen. §1, Erstauflage 1991, in der 19. Juli 2011, letzte Änderung 12. Juni 2013.
- Torres-Gonzalez P, Soberanis-Ramos O, Martinez-Gamboa A, Chavez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, Torres-Rojas M, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, Singh M, Gonzalez-Aguirre A, Ponce de Leon-Garduño A, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-Del-Valle M. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by

Mycobacterium bovis. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013; 7(4):e2177.

Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. J. Virol. Methods. 2007; 140(1-2):115-123.

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:406-409.

van Ingen J, Rina de Zwaan R, Dekhuijzen R, Boeree M, van Soolingen D. Region of Difference 1 in Nontuberculous Mycobacterium Species Adds a Phylogenetic and Taxonomical Character. J. Bacteriol. 2009; 191(18):5865-5867.

van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. Emerg. Infect. Dis. 2012; 18(4):653-655.

van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29(11):2578-2586.

van Soolingen D, de Haas PE, Haagsma J, Eger T, Hermans PW, Ritacco V, Alito A, van Embden JD. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:2425-2433.

van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J. Intern. Med. 2001; 249:1-26.

Vordermeier HM, Whelan AO, Hewinson RG. The scientific case for the gamma-interferon Bovigam assay. Gov. Vet. J. 2008; 19:38-43.

Wallgren A. The time table of tuberculosis. Tubercle 1948; 29:245-251.

Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesselink A, Engelke E, de Kock M, Gutierrez MC, Chege GK, Victor TC, Hoal EG, van Helden PD. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. Int. J. Tuberc.

Lung Dis. 2006; 10(7):818-822.

Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S, Coussens P, Meade KG, Hope JC, Estes DM. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. Clin. Dev. Immunol. 2011; 2011:768542.

Westermann J, Pabst R. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. Clin. Investig. 1992; 70(7):539-544.

WHO. Global Tuberculosis Report 2012. 2012

Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. Res. Vet. Sci. 1990; 49(1):46-49.

Zanella G, Durand B, Hars J, Moutou F, Garin-Bastuji B, Duvauchelle A, Ferme M, Karoui C, Boschirolu ML. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. J. Wildl. Dis. 2008; 44(1):99-108.

VIII ANHANG TABELLEN UND ABBILDUNGEN

ANHANG Tabellen

Tabelle A 1: Angaben zur Durchführung der RD4 long-range PCR

MasterMix	µl	Konzentration im Ansatz	
RNase-free Water	26,1		
LongeRange PCR Puffer mit Mg	5	1 x; 2,5 mM Mg	} Komponenten des Kits: QIAGEN LongeRange PCR Kit (20) (Cat. No. 206401)
dNTP Mix (10 mM each)	2,5	je 500 µM each dNTP	
Q-Solution	10	1 x	
LongeRange PCR Enzyme Mix	0,4	2 U	
DNA (ca. 2,5 ng/µl)	1		
Primer RD4-flankF	2,5	0,5 µM	5'-CTC GTC GAA GGC CAC TAA AG-3' (BROSCH et al., 2002)
Primer RD4-flankR	2,5	0,5 µM	5'-AAA GGA GCA CCA TCG TCC AC-3' (WARREN et al., 2006)
Gesamtvolumen	50		

Thermalprofil	°C	Zeit	
10 Zyklen:	93	3 min	
	93	15 s	
	55	30 s	
	68	13 min	1 min / 1 kb
28 Zyklen:	93	15 s	
	55	30 s	
	68	13 min	+ 20 s in jedem zusätzlichen Zyklus

Tabelle A 2: RD4-Typisierung von 35 neuen *M.-caprae*-Isolaten anhand der in der Publikation erstellten PCR-Ansätze

RD4-Typ	Stamm ID	isoliert aus	Herkunft	Jahr	PCR Ergebnisse				Bemerkung
					RD4-internal left part	RD4-internal central part	RD4 38-kb deletion flanking	RD4 5-kb deletion flanking	
Allgäu	V-07-266	Rotwild	OA	2007	+	+	-	-	1,4
	12/D207	Rotwild	OA	2012	+	+	-	n.d.	2,4
	12/D452	Rotwild	OA	2012	+	+	-	-	2,3
	12/D412	Rotwild	OA	2012	+	+	-	-	2,3
	12/D342	Rotwild	OA	2012	+	+	-	-	2,3
	12/D836	Rotwild	OA	2012	+	+	-	-	2,3
	13/Rd36287	Rind	OA	2013	+	+	-	-	1,3
	13/Rd36281	Rind	OA	2013	+	+	-	-	1,3
Lechtal	12/D187	Rotwild	OA	2012	-	-	+	n.d.	1,4
	12/D204	Rotwild	OA	2012	-	-	+	n.d.	1,4
	12/D213	Rotwild	OA	2012	-	-	+	n.d.	1,4
	12/D337	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D491	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D400	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D430	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D487	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D581	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D566	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D787	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D577	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D330	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D847	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/D398	Rotwild	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	12/F002	Fuchs	OA	2012	-	-	+	-	2,3
	13/Rd29210	Rind	OA	2013	-	-	+	-	1,3

Tabelle A2: Fortsetzung

RD4-Typ	Stamm ID	isoliert aus	Herkunft	Jahr	PCR Ergebnisse				Bemerkung
					RD4-internal left part	RD4-internal central part	RD4 38-kb deletion flanking	RD4 5-kb deletion flanking	
Karwendel	V-09-350	Rind	TÖL	2009	-	+	-	+	1,4
	12/D310	Rotwild	TÖL	2012	-	+	-	+	2,4
	12/D307	Rotwild	TÖL	2012	-	+	-	+	2,3
	12/D344	Rotwild	TÖL	2012	-	+	-	+	2,3
	12/D306	Rotwild	TÖL	2012	-	+	-	+	2,3
	12/D347	Rotwild	GAP	2012	-	+	-	+	2,3
genetische Variationen	12/Rd90046	Rind	Mühldorf	2012	+	+	-	-	1,4
	13/Rd35877	Rind	Rumänien	2013	-	+	-	-	1,3
	MI12/10775	Rind	Spanien	2012	+	+	-	-	4,5
	MI12/08124	Rind	Spanien	2012	+	+	-	-	4,5

- 1 Isolate stammen aus der am LGL durchgeführten Tuberkuloseroutinediagnostik, Speziesdifferenzierung erfolgte durch den GenoType® MTBC von Hain Lifescience GmbH.
- 2 Isolate wurden im Rahmen des EMIDA ERA-Net Projektes am LGL isoliert (<http://tb-alpine-wildlife.org>), Speziesdifferenzierung erfolgte durch den GenoType® MTBC von Hain Lifescience GmbH.
- 3 PCR-Ansätze wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit der Technischen Universität München von Lorena Buchelt am LGL durchgeführt ("Subtypisierung von Mycobacterium caprae-Isolaten aus dem bayerischen Alpenraum anhand der RD4-Region", 06.08.2013)
- 4 PCR-Ansätze wurden im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit von der Autorin durchgeführt
- 5 DNA und Angaben zu den Isolaten einschließlich Spoligotype wurden zur Testung durch die etablierte RD4-PCR-Methodik von Frau Prof. Dr. Alicia Aranaz zur Verfügung gestellt.

n.d.: PCR nicht durchgeführt

OA: Oberallgäu

GAP: Garmisch - Patenkirchen

TÖL: Bad Tölz - Wolfratshausen

Tabelle A 3: Überblick der durchgeführten Teilprojekte zur Subtypisierung der *M.-caprae*-Isolate in Kooperation des LGL Oberschleißheim¹ mit dem Genzentrum der LMU² und der Medizinischen Universität Innsbruck³

Teilprojekt	Arbeitsschritte	Institut
Herkunft der <i>M.-caprae</i>-Isolate	<ul style="list-style-type: none"> • Auswahl der Isolate aus der LGL-Stammsammlung, der laufenden Routinediagnostik am LGL und des "TB Alpine Wildlife" Projektes (http://tb-alpine-wildlife.org) • Anzucht • DNA-Präparation 	1
Gesamtgenomsequenzierung	<ul style="list-style-type: none"> • Erstellung von Sequenz-Bibliotheken (libraries) • Sequenzierung mittels MiSeq-Illumina • Hinterlegung der Rohdaten in der Galaxy-Datenbank • Mapping der Daten auf Referenzgenome • Hinterlegung der Dateien (Bam files) der gemappten Genome in der NCBI GenBank 	2
Genotyping	<ul style="list-style-type: none"> • MIRU-VNTR-Typing • Spoligotyping 	3
Datenanalyse und Ergebnispräsentation	<ul style="list-style-type: none"> • Koordination aller Teilprojekte • Datenanalyse der Genotyping-Ergebnisse • Auswahl von geeigneten Referenzgenomen • Analyse der <i>M. caprae</i> Genome mittels IGV • Ableitung und Design von flankierenden Primern der Deletionen • Durchführung der konventionellen und real-time PCR Ansätze • Präparation von PCR-Amplifikaten für die Sequenzierung • Blast und Alignment von Sequenzen • Hinterlegung der RD4 spezifischen Sequenzen in der NCBI GenBank • Ausarbeitung der Ergebnisse • Manuskript-Ausarbeitung für die Publikation • Beaufsichtigung einer Bachelorarbeit der Technischen Universität München von Lorena Buchelt am LGL zur Subtypisierung weiterer <i>M.-caprae</i>-Isolate 	1

ANHANG ABBILDUNGEN

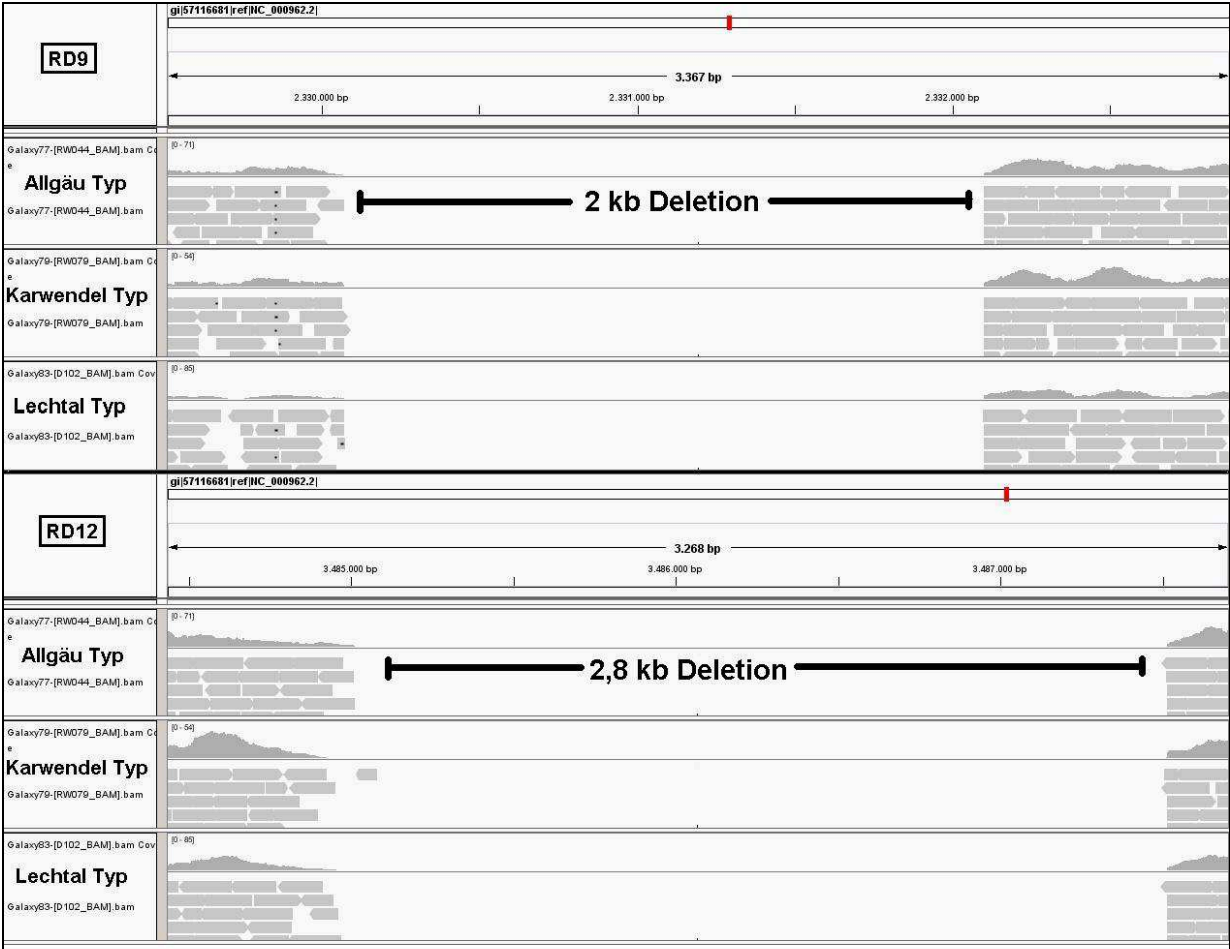


Abbildung A 1: Darstellung der Genomsequenzen von *M. caprae* im Bereich der RD9 und RD12

Abgebildet sind die gemappten MiSeq Sequenz-Daten der Isolate 09/RW044, 10/RW079 und 11/D102 auf das Referenzgenom von *M. tuberculosis* H37Rv (GenBank database, accession number CP003248) im IGV (Sequenz in 5' - 3').

Die nach BROSCH et al. (2002) definierten Sequenzen der RD9 und RD12 sind in den Genomen der *M.-caprae*-Typen Allgäu, Lechtal und Karwendel, wie in verschiedenen Studien für *M. caprae* beschrieben (ARANAZ et al., 2003), nicht vorhanden.

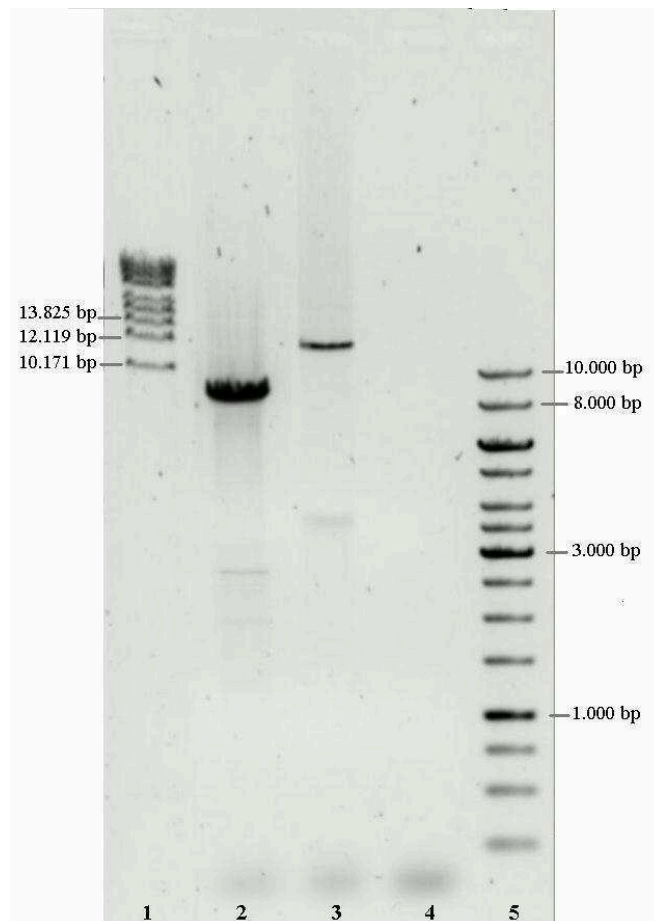


Abbildung A 2: Visualisierung der RD4 long-range PCR-Produkte der RD4-Typen Karwendel und Allgäu durch Gelelektrophorese

1. GeneRuler High Range DNA Ladder 10.171 - 48.502 bp (Thermo Scientific SM1351)
2. 11/D028 (Karwendel-Typ) RD4 spezifische Bande bei ca. 8.000 bp
3. 09/RW044 (Allgäu-Typ) RD4 spezifische Bande bei ca. 12.000 bp
4. Mastermix
5. GeneRuler 1 kb DNA Ladder 250 - 10.000 bp (Thermo Scientific SM0314)

Agarose Gel 0,5 %, Laufzeit 2 Stunden bei 66 V, 1 μ l Ladepuffer, 9 μ l DNA

IX DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner danke ich für die Bereitstellung des Themas, die umfangreiche Unterstützung zur Anfertigung dieser Arbeit und die vielen Möglichkeiten, die sich im Rahmen dieser Arbeit für mich aufgetan haben.

Herrn Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger danke ich für die jederzeit gegenwärtige Betreuung, das Vertrauen und die Motivation zur Erstellung dieser Arbeit.

Generell danke ich allen Autoren der Publikation für die freundliche Unterstützung, Beantwortung vieler Fragen und Lösung einiger Probleme.

Vielen Dank an das Bundesministerium für Bildung und Forschung, das die Studie in Auftrag gegeben und finanziert hat, sowie an alle Beteiligten im EMIDA ERA-Net Projekt "Tuberculosis in Alpine Wildlife" (BMBF-FK0315857A).

Mein besonderer Dank im Rahmen des EMIDA ERA-Net Projektes gilt Florian Sedlmaier, dessen zuverlässige Kooperation ein grundlegender Bestandteil für das Projekt war.

Ein großes Dankeschön an Susanne Gellert und Heike Lang für die Einweisung in die Laborarbeit, vielzähligen Hilfestellungen, aufmunternden Worte und netten Tanzeinlagen.

Anna Brücklmeier, Schirin Friederichs, Jessica Pippig und Anna Lena Rettinger danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten, ich immer auf ihre Hilfe zählen konnte und auch der Spaß nicht zu kurz gekommen ist.

Meiner Patin, Ulrike Lüning danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung und das große Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Meinen Geschwistern, Fabienne und Dominic Domogalla danke ich dafür, dass wir immer zueinander halten und alles mit der nötigen Portion Humor verarbeiten können.

Meinen Eltern, Annette Lüning-Domogalla und Bernd Domogalla danke ich dafür, dass sie mir so vieles in meinem Leben ermöglicht haben und auch jetzt immer fest an meiner Seite stehen.

Werner, danke, dass du den ganzen Weg mit mir gehst. Genau dann, wenn es schwarz wird, bist du derjenige, der an mich glaubt und mir die nötige Kraft gibt. Ohne dich, wäre es nicht möglich gewesen.